Universitatea de Stat de Medicină
şi Farmacie "N. Testemiţanu"

L. LÎSÎI



BIOCHIMIE

MEDICALĂ

Chişinău 2007

Universitatea de Stat de Medicină şi Farmacie "N. Testemiţanu"

L. LÎSÎI



BIOCHIMIE

MEDICALĂ

Chişinău 2007

Aprobat de Consiliul metodic central al U.S.M.F. "Nicolae Testemițanu"

Recenzenți:

I.Vaintraub, şef al laboratorului "Biochimia proteinelor" de la U.S.M., profesor universitar, doctor habilitat în biologie

V.Gudumac, şef al laboratorului "Biochimie" în L.Ş.C. de la U.S.M.F. "Nicolae Testemițanu", profesor universitar, doctor habilitat în medicină

V.Hotineanu, profesor universitar, doctor habilitat în medicină, Laureat al Premiului de Stat al RM în domeniul Ştiinţei şi Tehnicii, Om Emerit

CUPRINS

Publicarea manualului „Biochimie medicală» costituie o inițiativă meritorie a profesorului universitar Leonid Lîsîi, șef catedră biochimie și biochimie clinică, USMF ”N.Testemițanu”, care a extins conținutul cu date relevante în aspect teoretic și aplicativ.

O reediție a manualului precedent, primul manual consacrat biochimiei, e destul de bine venită pentru școala națională. Biochimia, ca produs al gîndirii laborioase și al atenției permanente a majorității savanților, are în ultimii anii un succes deosebit.

Materialul redat e compact aranjat și ilustrează esența contemporană a științei date. Progresul în medicină nu poate fi conceput fără o argumentare științifică, de natură biochimică, la diferite niveluri. Implicarea biochimici în specificul medical atît în explicarea stărilor normale, cît și patologice reclama imperios cunoașterea reacțiilor moleculare, enzimelor specifice, ciclurilor tipice ale metabolismului, care au loc în toate celulele umane. În fiecare capitol sunt ilustrate compartmentele de bază ale biochimiei moderne, cu adaosul concis al realizărilor din ultimii ani. Conținutulul e mult apropiat de medicina practica - sunt expuse valorile normale ale majorității indicilor biochimici ce se utilizează în diagnosticul și pronosticul maladiilor. O importanță deosebită are redarea mecanismelor fine de reglare a metabolismului de către diferiți factori (hormoni, ioni, vitamine, medicamente) la diverse niveluri de organizare a materiei vii.

Autorul și-a asumat o responsabilitate distinsă de a prezenta acest material vast, profund științific, într-un volum modest, strict necesar pentru înțelegerea și dezvoltarea capacităților intelectuale ale viitorului medic.

Manualul prezintă o bază științifică pentru viitorii savanți și/sau medici practicieni, care doresc să atingă culmile științei moderne, să-și consolideze și să-și completeze nivelul cunoștințelor în domeniul medicinii.

Ieremia ZOTA
d.h.m., profesor universitar,
Laureat al Premiului de Stat al RM
în domeniul Științei și Tehnicii,
Om Emerit, membru corespondent a AȘM

CUVÎNT ÎNAINTE

Prezentarea unui manual de biochimie este o încercare deosebit de dificilă la momentul actual, cauzată de avalanşele de informaţie ce se succed rapid în acest domeniu. Biochimia nu mai reprezintă o enumerare simplă a proceselor biologice şi reacţiilor fermentative ce decurg cu participarea unui numar enorm de compuşi organici.

Evaluarea accelerată a cunoştinţelor în biochimie, mai ales în ultimul deceniu, precum şi importanţa ştiinţei date pentru înţelegerea bazelor moleculare ale fenomenelor fiziologice, patologice şi terapeutice impune ca această disciplină să ia o poziţie privilegiată în cadrul învăţămîntului medical, farmaceutic, biologic etc.

Aplicaţiile practice ale biochimiei sunt atît de imediate în genetică, medicină, nutriţie şi în alte domenii de activitate, încît progresul lor nu poate fi conceput fără o argumentaţie ştiinţifică de natură biochimică. Aspectul practic farmaceutic este imprimat de faptul că sunt prezentate substanţele biologic active, iar medicamentele valoroase de origine biologică fac parte din categoria enzimelor, vitaminelor, hormonilor, aminoacizilor, acizilor graşi esenţiali etc.

Conform prevederilor programei analitice sunt abordate problemele cardinale ale cursului disciplinar tratat în opt capitole. Materialul e destinat să contribuie la înţelegerea de către studenţii în medicină a bazelor moleculare, care asigură funcţia şi structura morfologică a organelor şi ţesuturilor din organismul uman. Implicaţiile biochimiei în toate specialităţile medicale la explicarea stării normale şi patologice, reclamă cunoaşterea reacţiilor moleculare din ciclurile stereotipe ale metabolismului care se desfăşoară în toate celulele din organism.

Voi accepta toate sugestiile şi observaţiile referitoare la conţinutul acestei lucrări.

Am avut ocazia deosebită să fac studiile în Universitatea de Stat de Medicină şi Farmacie "N. Testemiţanu", să fiu discipolul acelor dascăli care au stat la temelia ei. Sunt recunoscător colegilor cu care permanent colaborez în activitatea pedagogică şi ştiinţifică pentru ajutorul acordat, susţinere şi conlucrare benefică.

Închin această carte studenţilor care sunt speranţa acestui popor, fundamentul spiritual al neamului, devenind după o muncă enormă, savanţi ce vor proslăvi acest pămînt.

Autorul

PREFAȚĂ

Editarea cărții „Biochimie medicală" aflată la a doua ediție are o conotație deosebită. Progresele acestei științe sunt uimitoare, capabile să explice, prin modificări la nivel molecular și atomar, cele mai dificile comportări ale materiei vii.

La dispoziția studenților medici se pune un vast volum de cunoștințe ce corespund cerințelor actuale, demne de atenția celor ce studiază viața. Sunt redate detalii științifice de interes biochimic și medical, sunt expuse diverse aspecte de genetică medicală.

Studenților le sunt oferite aceste date științifice pentru a-i ajuta să-și pună un fundament puternic în studiul medicinii contemporane.

Manualul de biochimie medicală utilizat de studenți trebuie să asigure realizarea următoarelor deziderate:

a) asimilarea cunoștințelor științifice despre fenomenele studiate în disciplinile inrudite preclinice (fiziologie, fiziopatologie, farmacologie);

b) stimularea interesului pentru studierea și înțelegerea proceselor fiziologice și patologice predate în cursul clinic medical;

c) integrarea științifică în variata cazuistică medicală întâlnită în studiul disciplinelor clinice care poate fi înțeleasă numai dacă se va realiza în baza noțiunilor și cunoștinților acumulate în anii precedenți.

Cunoașterea proceselor biochimice fundamentale și bazate pe elucidarea acestor mecanisme, utilizarea unor teste de diagnostic - acesta e viitorul apropiat pentru diferitele domenii ale medicinii practice.

Cele reprezentate pot fi și un imbold pentru viitorii savanți, care își vor închina viața studiului fascinantelor compartimente ale biochimiei moderne și medicinii.

Exprim cordiale mulțumiri tuturor celor care au favorizat realizarea acestui volum, și îndeosebi colaboratorilor pentru amabilitate și receptivitate.

Și mă gîndesc la studenții care, studiind acest material și descoperind tainele vieții, vor conștientiza că s-a depus un efort considerabil pentru viitorul. Mă încred în tinerii, de azi specialiști redutabili de mîine, care vor făuri un viitor demn de înaintașii noștri.

Autorul

NOȚIUNI GENERALE

Călăuzit de relevările spirituale şi practice, omul a depus şi depune încontinuu eforturi de a pătrunde sensul vieții. La diferite etape de dezvoltare a gîndirii el a desprins cele mai fine legități ale existenței materiei vii. Anticii nu încetau să se minuneze de frumusețea şi misterele naturii ființelor vii, remarcînd noi şi noi fenomene, exprimări ale perfecțiunii ei, dar nu erau în stare să explice esența şi armonia lumii înconjurătoare. Marele adevăr era interpretat că Mîntuitorul a creat această lume.

Calea de acumulare a cunoştințelor a fost lungă şi complicată. Aspectul ştiințific îşi croia drumul prin scolastica şi metafizica materialiştilor din epoca timpurie. Descoperirea lui C. Darwin a contribuit la descătuşarea spiritului uman. În baza unor date modeste şi a analizei profunde în domeniul paleontologiei, el formulează cea mai vastă şi universală concepție în biologie - evoluția biologică continuă.

Studiile savanților din jumătatea a doua a secolului XIX sunt inspirate de această concepție. Dezvoltarea impetuoasă a chimiei organice, anorganice şi fizice a permis şi cercetarea unor sisteme vii - creşte şi numărul compuşilor extraşi din organismele vii.

Complexitatea obiectelor materiale a condus la diferențierea cercetărilor ştiințifice. Emil Fisher a determinat structura multor glucide, a elaborat metode de extragere a aminoacizilor din hidrolizate proteice, a stabilit configurațiile optice ale aminoacizilor şi glucidelor, a demonstrat specificitatea acțiunii enzimelor. Aceste studii au stat la baza biochimiei.

Termenul **biochimie** a fost aplicat pentru prima dată în 1903 de către Carl Neiberg. Astfel, pornind de la pilonii chimiei organice şi fiziologiei noua ştiință s-a structurat în mai multe aspecte: enzimologie, imunologie, genetică, etc - încît astăzi optica cercetărilor eclipsează oportunități din cele mai strigente ale problemelor actuale.

Ce reprezintă azi biochimia modernă?

1. Savanții, în calitate de criteriu, în investigațiile lor iau în considerare mărimea particulelor studiate. Biochimiei îi corespunde aranjamentul atomilor în moleculă, adică la nivel molecular. **Bios** în limba greacă înseamnă *viață*. Prin urmare, **biochimia este ştiința care studiază bazele moleculare ale vieții.**

2. Compuşii organici simpli, constituentele organismelor aparțin doar lumii vii şi sunt produse ale activității biologice. Aceşti compuşi sunt numiți **biomolecule** şi au rol funcțional de a servi drept blocuri de construcții în formarea structurilor biologice. Ele au fost selectate evolutiv datorită capacității de a îndeplini funcții strict determinate în celulele vii. În toate organismele vii aceşti compuşi sunt similari, interdependenți, care interacționează, participă la procesele de transfer al energiei şi ale transformărilor de substanțe. Prin urmare, aceste biomolecule pot fi caracterizate din două puncte de vedere: chimic şi biologic, ceea ce denotă că **biochimia este o superchimie a materiei organizat perfect, fapt ce oferă largi posibilități în studiul tainelor organismelor vii, o chimie a celei mai perfect organizate materii.**

Biochimia este una dintre sferele ştiințifice cele mai atrăgătoare în aplicarea rațiunii umane, a talentului şi forțelor creatoare ale tineretului. Ea înregistrează succese

remarcabile şi o evoluţie continuă.

În ce rezidă succesul acestei ştiinţe?

1. Biochimia a reuşit să elucideze bazele chimice ale unui şir de probleme referitoare la structurile biomoleculelor şi proceselor metabolice ca: dublul helix al DNA, codul genetic, structura tridimensională a unor proteine, căile generale ale metabolismului.

2. Datorită biochimiei au fost determinate căile generale de transformare a moleculelor şi a principiilor ce stau la baza diferitelor forme de exprimare a vieţii. Omul şi bacteriile au mult în comun la nivel molecular - aceleaşi blocuri de construcţii pentru formarea macromoleculelor, identitatea transmiterii informaţiei genetice de la DNA ⟶ RNA ⟶ proteină, iar ATP, valuta energetică, este folosită în ambele cazuri.

3. Biochimia are o influenţă tot mai surprinzătoare asupra medicinei, mai ales în stabilirea diagnosticului clinic în baza activitatii enzimelor. Conţinutul (prezenţa) unor enzime în serul sanguin poate servi drept criteriu determinant al diagnosticului infarctului miocardic, hepatitelor etc. Anume biochimia este suportul medicaţiei. O importanţă deosebită o are elucidarea mecanismelor moleculare ce stau la baza unor afecţiuni ereditare, a anomaliilor metabolismului.

Biochimia are o vastă aplicare, fiind destinată atît studenţilor, medicilor, biologilor, chimiştilor, cît şi oricărui om inteligent. Puţini conştientizează că un termen, azi simplu pînă la banalitate, conţine un revers - munca titanică a multor savanţi, unii dintre care au fost distinşi cu premiul Nobel.

4. Evoluţia rapidă a biochimiei le-a permis savanţilor să cerceteze probleme cruciale în biologie, medicină, cum ar fi: diferenţierea celulelor şi reglarea creşterii lor, determinarea rolului celulelor la formarea organismului, la dezvoltarea mecanismului memoriei, în determinarea cauzelor cancerului şi schizofreniei etc. Deocamdată răspunsuri complete la multe întrebări nu avem, dar un lucru e cert - toate aceste probleme sunt determinate de factorii moleculari ce se modifică continuu.



Charles Darwin
1809 - 1882



Emil Fisher
1852 - 1919

PARTICULARITĂȚILE MATERIEI VII

Constituenții materiei vii sunt compuşi din moleculele materiei moarte. Ele în parte, se supun legilor ce caracterizează comportarea obiectelor inanimate, cu toate că întrunesc calități neordinare. Cea mai concludentă particularitate este complexitatea şi *gradul înalt de organizare* ce se caracterizează prin structura internă compusă şi diversitatea de molecule. Organismele vii sunt reprezentate prin milioane de specii. O altă particularitate constă în faptul că *orice parte componentă își are sensul său specific și îndeplinește o funcție strict determinată.* Aceasta se referă nu numai la structurile macroscopice, dar şi la structurile intracelulare microscopice, cum ar fi nucleul. Structurile acestea sunt înzestrate cu funcții speciale şi compuşi ce se conțin în celulă - proteine, lipide. A treia particularitate care ne apropie de sensul proceselor vitale constă în faptul că *organismele vii sunt capabile să extragă, să transforme şi să utilizeze energia mediului ambiant fie sub forma compuşilor organici nutritivi, fie sub forma energiei solare.* Ultima particularitate permite organismelor să-şi generează sursa lor proprie de energie şi să-şi asigure integritatea. Pe contul acestei energii se efectuează lucrul mecanic, se realizează transferul membranar al substanțelor. Organismele vii niciodată nu se află în stare de echilibru în ceea ce priveşte procesele declanşate de organismul propriu-zis, precum şi în interacțiunea cu mediul ambiant. Dar cea mai surprinzătoare particularitate a organismului este *capacitatea de a se reproduce, a se înmulți, a se procrea, însuşire ce poate fi considerată drept chintesența lui.*

Este evident că organismele vii sunt compuse din aceleaşi molecule, dar care ar fi totuşi cauza că materia vie se deosebeşte radical de cea moartă?

De ce organismul viu este ceva mai mult decît totalitatea componenților avitali? Anume aceasta este problema principală ce relevă sensul biochimiei. **Scopul final al ştiinței biochimia rezidă în perceperea enigmelor vieții sub toate formele ei**. Şi, ca rezultat, avem nevoie de un student, viitor medic specialist care să nu fie doar un "dicționar" al termenilor biochimiei, dar şi apt să aprecieze critic şi constructiv datele experimentale pe care se bazează cunoştințele noastre despre procesele vitale.

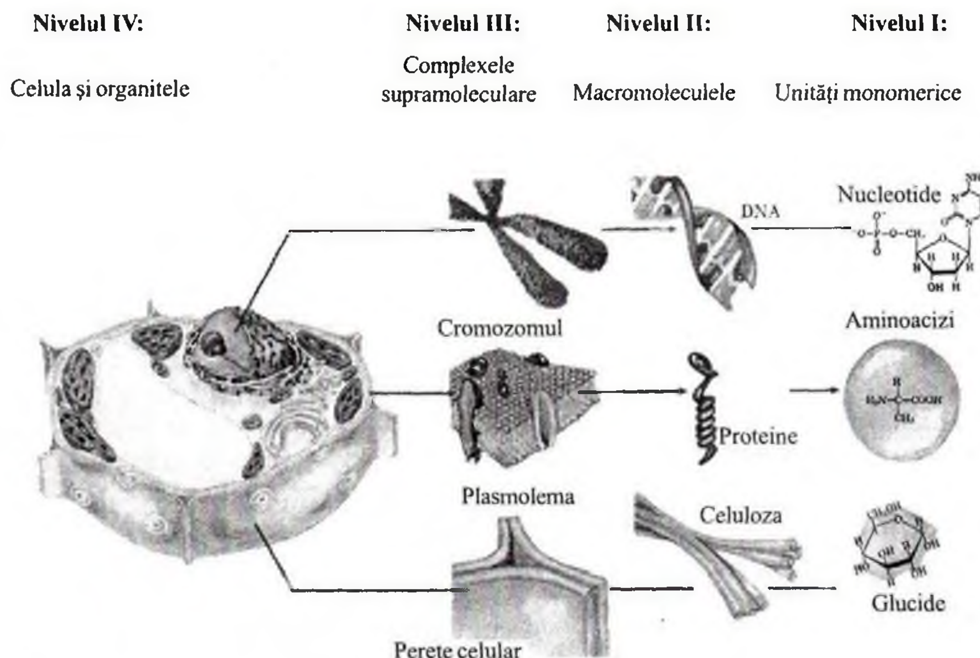
În studiul disciplinei deosebim trei compartimente:

1. Biochimia statică - studiază în exclusivitate analiza, componența chimică a organismelor.
2. Biochimia dinamică - elucidează complexitatea modificărilor de substanțe în organism.
3. Biochimia funcțională - cercetează procesele chimice ce stau la baza diferitelor manifestări ale vitalității.

Biochimia este o ştiință experimentală, succesul căreia e legat indispensabil de capacitatea de a experimenta, bazată pe cunoştințele moderne, utilizînd o tehnică avansată de laborator, precum şi de sinteza datelor înregistrate, o interpretare şi analiză veridică a explorărilor efectuate.

În ierarhia structurală a milioanelor de proteine diferite, de exemplu, deosebim, mai multe niveluri de organizare: atomar, molecular, celular. Pentru activitatea organului respectiv e caracteristic nivelul corespunzător, iar pentru organismul integru - forma superioară de organizare a materiei vii.

Cea mai importantă direcţie în dezvoltarea biochimiei contemporane e studierea proceselor biochimice la nivelul molecular. Viteza acestor procese e determinată de diverşi factori ca: concentraţia ingredienţilor, pH, bariera energetică, activitatea fermenţilor respectivi, prezenţa activatorilor şi inhibitorilor. Interacţiunea dintre aceşti factori se efectueaza în mod diferit, cu o reflecţie indispensabilă în procesele reglatoare la diferite niveluri.



Ierarhia structurală în organizaţia moleculară a celulelor

Un alt important nivel de studiu este cel multienzimatic, vizînd proteinele specifice reglatoare, ce intră în componenţa endo- şi exomembranelor.

Compartimentele intracelulare se caracterizează prin prezenţa unor procese biochimice dominante. Aceste structuri se deosebesc nu numai morfologic şi citochimic, dar şi biochimic. Anume la acest nivel are loc compartimentalizarea şi specificarea proceselor biochimice. Ca obiect pentru studiul metabolismului energetic servesc mitocondriile, iar procesele biosintetice sunt concentrate în ribozomi şi fracţiunile citoplasmatice.

La nivelul celular are loc o interacţiune între procesele biochimice în diferite structuri intracelulare, cu integrarea lor. La acelaşi nivel, datorită prezenţei în celule a diferitelor mecanisme reglatoare, se evidenţiază o acţiune specifică evidentă a substanţelor biologice active: hormoni, mediatori, oligopeptide, stimulenţi şi inhibitori. Acţionînd asupra sistemelor polienzimatice, apariţia mecanismelor reglatorii condiţionează un echilibru dinamic al proceselor biochimice şi de aceea celula intactă e în stare de *homeostazie*. W.Canon propune acest termen în 1929 pentru determinarea constantei mediului intern - condiţie indispensabilă pentru existenţa organismelor vii. Acest echilibru e circumstanţa primordială a proceselor de autoasamblare, autoorganizare şi autoreglare, ce determină funcţiile

biologice cardinale: creşterea, înmulţirea, mitoza şi diferenţierea celulelor. Starea de homeostazie se păstrează nu numai în condiţii normale, dar şi la acţiunea diferitor factori nocivi asupra organismului şi, de asemenea, în stări de stres. În aceste condiţii homeostazia e determinată de prezenţa în organism a sistemelor complexe reglatoare coordonate de mecanisme adaptive.

Studierea profundă şi vastă a proceselor biochimice ce determină menţinerea homeostaziei, graţie mecanismelor de adaptaţie, e o problemă actuală a biochimiei funcţionale. Aceste investigaţii determină esenţa proceselor chimice ce stau la baza funcţiilor fiziologice şi pot preciza mecanismele reglatorii ce delimitează homeostazia în stări extremale. Aceasta e o problemă ce prezintă atît interes teoretic, cît şi practic.

În ultimii 30-40 de ani în studiile biochimice au apărut modificări radicale datorită utilizării *metodelor moderne de cercetare.* A crescut considerabil sensibilitatea şi exactitatea aprecierilor cantitative ale diferitor metaboliţi în structurile biologice.

Datorită **spectroscopiei infraroşii** se poate studia caracterul structural al moleculei, e posibilă determinarea diferitor compuşi străini în microcantităţi. Perfecţionarea *metodei cromatografice* - în straturi subţiri - a permis extragerea metaboliţilor individuali din ţesut chiar şi atunci, cînd ei sunt în cantităţi minime. O caracteristică deosebită o au *metodele imunochimice* care au favorizat şi au justificat identificarea proteinelor individuale, secvenţa aminoacizilor în lanţ.

Un rol deosebit aparţine metodei de *depistare radioactivă*, metodă care facilitează studierea metabolismului plastic şi energetic în condiţii adecvate organismului intact.

O răspîndire largă o are metoda de înregistrare a izotopilor (*scintigrafia*) ce ne permite examinarea perfectă a proceselor metabolice la toate nivelurile sistemelor vii. La baza ei se află procesul de transformare a energiei particulelor primare radioactive în energia radiaţiei electromagnetice cu lungimea de undă 430 nm. Transformarea energiei este efectuată de scintilator (lichid - pentru β-particule şi cristal - pentru Y-particule). Absorbind energia particulelor radioactive, scintilatorul elimină fotoni ce se înregistrează pe amplificatorul fotoelectronic.

Incontestabil că succesul biochimiei depinde de realizările vădite în ştiinţele înrudite precum sunt: bioorganica, anorganica, chimia analitică, fizică şi coloidală, biologia, fizica şi chiar matematica.

Rolul biochimiei pentru medicină e de netăgăduit, ca argument servesc doar cuvintele lui M.V. Lomonosov : "Medicul - fără cunoştinţe suficiente în chimie - nu poate fi competent în materie".

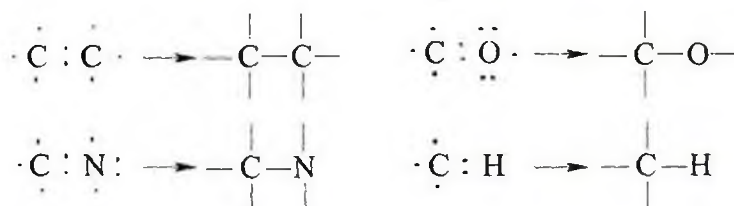
Foarte accelerat se dezvoltă **biochimia clinică**, care studiază modificările proceselor biochimice în organismul uman în diferite patologii şi, concomitent, elaborîndu-se metodele depistării anumitelor devieri cu scopul de a diagnostica şi a pronostica evoluţia stărilor morbide. În ultimii 10 ani, numărul analizelor chimice la un bolnav a crescut în medie de 4 ori. E necesar de menţionat că descrierea datelor de laborator este direct dependentă de gradul şi nivelul de instruire a medicului.

Compuşii chimici în organismele vii sunt complecşi şi variaţi după structura lor şi sunt supuşi modificărilor permanente. Masa unor molecule e de milioane de Da (daltoni). Modificările conformaţionale ale macromoleculelor biologice au loc foarte repede.

Pentru despletirea unei spirale de DNA, utilă pentru replicare şi expresie, e necesară numai o milisecundă.Modificarea poziţională a unui domen de proteină faţă de altul e de o nanosecundă, iar fenomenul de senzaţie optică - modificări structurale ale grupelor luminoabsorbante - are loc în cîteva picosecunde.

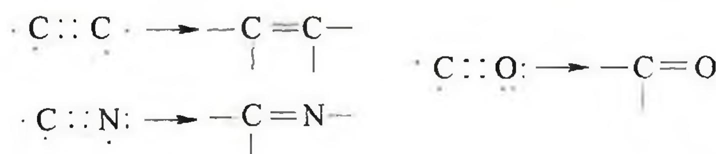
Pentru a percepe mai profund structura şi funcţiile proteinelor, e necesar să ne amintim de unele *proprietăţi ale biomoleculelor*. Organismele vii conţin în cantităţi mai mari 4 elemente: H, O, C si N. Dacă excludem H_2O, căreia îi revine 75% din greutate, apoi 90% din masa reziduală le revine acestor patru elemente. Din masa totală uscată carbonului îi revin 50-60%, oxigenului - 25-30%, azotului - 8-10% şi hidrogenului - 3-4 %.

1. Particularităţile chimice deosebite ale organismelor vii constau în prezenţa **carbonului**. El, la fel ca şi oxigenul, hidrogenul, azotul, poate forma **legături covalente**, adică legături determinate de perechi de electroni aparţinînd ambilor atomi.



Atomii participanţi la formarea acestor *legături covalente* pretind să-şi asigure complexitatea cercurilor externe de electroni. Fiecare pereche de electroni corespunde unei legături ordinare.

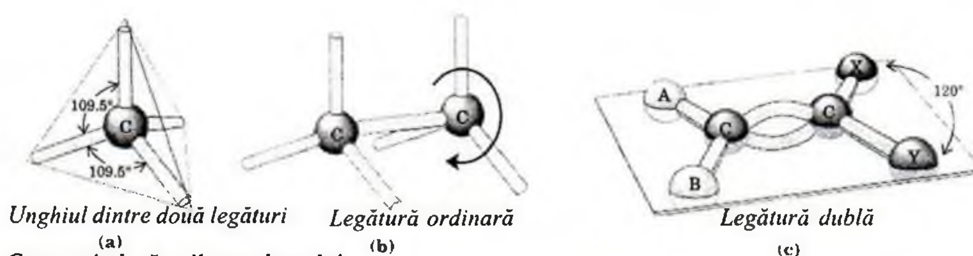
În biologie o importanţă primordiala o are capacitatea carbonului (C) de a diviza perechile electronice, acestea aderînd la alţi atomi de C, fapt ce duce la formarea unor **legături ordinare** foarte stabile. În plus, 2 atomi de C se pot îmbina între ei, conjugînd 2 perechi de electroni. Astfel se formează o **legătură dublă.**



Varietatea substanţelor are ca schelet atomi de carbon, ce formează legături covalente, practic infinite: liniare, ciclice, ramurale, structuri combinate etc.

Cele 4 legături covalente ordinare ale carbonului în spaţiu se configurează în tetraedru, iar mărimea unghiului dintre 2 legături indiferente e de $109{,}5^0$. În moleculele unor substanţe acest unghi poate să se modifice puţin. Datorită acestei proprietăţi, **compuşii carbonului formează diferite structuri tridimensionale**. Nici un alt element chimic nu poate forma molecule atît de diferite după mărime şi formă, după complexitatea lanţului periferic şi a grupelor funcţionale.

2. A doua proprietate de bază a compuşilor organici constă în faptul că particulele moleculare sunt capabile, absolut liber, să se rotească în jurul legăturilor C-C ordinare,



Unghiul dintre două legături (a) *Legătură ordinară* (b) *Legătură dublă* (c)

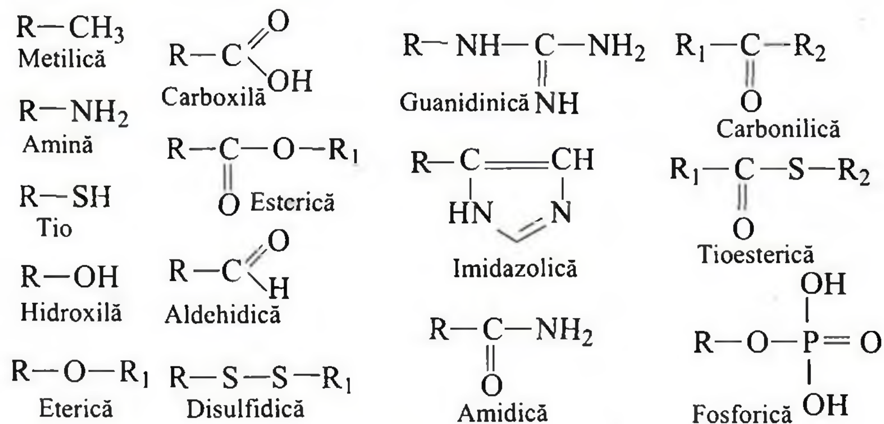
Geometria legăturilor carbonului

numai dacă la atomii de carbon, care iau parte la formarea acestei legături, nu sunt atașate grupe foarte mari sau au o sarcină electrică mare. În ultimele cazuri rotația poate fi limitată. Așadar, moleculele organice cu un număr mare de legături ordinare pot avea diferite forme numite ***conformații***, ce depind de unghiul de rotație al acestei legături.

3. A treia proprietate a legăturilor covalente formate de carbon constă în faptul că ele au o **anumită lungime**. În medie, lungimea legăturilor ordinare e de 0,154 nm; cele duble sunt mai scurte și, respectiv, egale cu 0,124 nm. Ultimele au o duritate mai mare și nu permit rotația liberă. Datorită acestei legături din moleculă unghiurile între moleculele ordinare se măresc.

Structura tridimensională (conformația) a biomoleculelor organice joacă un rol important în multe procese biochimice, dar mai ales în interacțiunea centrului catalitic al enzimelor cu substraturile. Pentru efectuarea funcțiilor biologice normale molecula enzimelor și a substraturilor trebuie să fie complementară, adică trebuie neapărat să coincidă. Astfel de complementare strictă e necesară pentru fixarea moleculei de hormon la receptorul său pe suprafața celulei, pentru procesul de replicare a DNA ș.a.

Poziția legăturilor ordinare în tetraedru atribuie unor compuși organici încă o proprietate deosebită, cu o repercusiune primordială în biologie. Să ne amintim că unul sau mai mulți atomi de hidrogen pot fi înlocuiți cu diferite **grupe funcționale**, care sunt reactibile și pot modifica repartizarea electronilor și poziția electronilor învecinați, modificînd astfel și reactibilitatea întregii molecule. Majoritatea biomoleculelor conțin grupe funcționale de diferite tipuri și de aceea posedă diferite insușiri polifuncționale, determinînd și activitatea biologică.

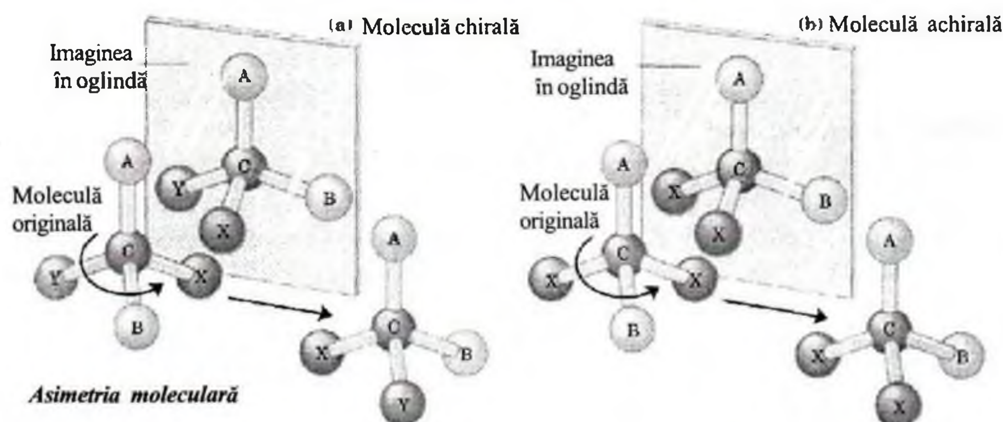


Unele grupe funcționale în biomolecule

Întotdeauna, cînd în molecula compuşilor organici atomul de carbon e legat cu 4 atomi sau grupe funcţionale diferite, se spune că acest atom e **asimetric**, deoarece el poate funcţiona în două forme izomerice, deosebindu-se printr-o configuraţie spaţială proprie - **enantiomerii (stereoizomeri sau izomeri optici)**. În reacţiile chimice izomerii se comportă în acelaşi mod, dar se deosebesc după o proprietate fizică, şi anume - după capacitatea de a roti planul luminii polarizate în stînga sau în dreapta.

Deoarece astfel de compuşi cu atomi de carbon se atestă în două forme, au fost numiţi **compuşi chiralici** (*chiros*-din greacă - *mînă*).

Atomul central asimetric din aceşti compuşi e numit **atom chiralic** sau **centru chiralic**. În organismele vii moleculele chiralice se află numai în una din cele două forme posibile, cauza fiind structura hiralică a moleculelor enzimelor.



Asimetria moleculară

În sistemele biologice e foarte răspîndit şi un alt tip de legătură - cea *de hidrogen*, care uşor se formează între atomul electronegativ (O şi N) şi atomul de hidrogen (H) legat covalent cu un alt atom electronegativ în aceeaşi sau altă moleculă. Atomii de hidrogen în asemenea condiţii comportă încărcături parţial pozitive, apropiindu-se de interacţiunea electrostatică. Legăturile acestea sunt mai slabe decît cele covalente. Una din particularităţile lor este duritatea maximă în condiţiile în care orientarea reciprocă a moleculelor legate determină o energie maximă a interacţiunii electrostatice. Legătura dată este determinată de o anumită direcţie şi datorită ei e aptă să reţină ambele molecule sau grupe într-o orientare reciprocă, determinînd complementaritatea suprafeţelor moleculelor activate. Aceste legături servesc drept orientare, ce creează un contact perfect dintre suprafeţele moleculare.



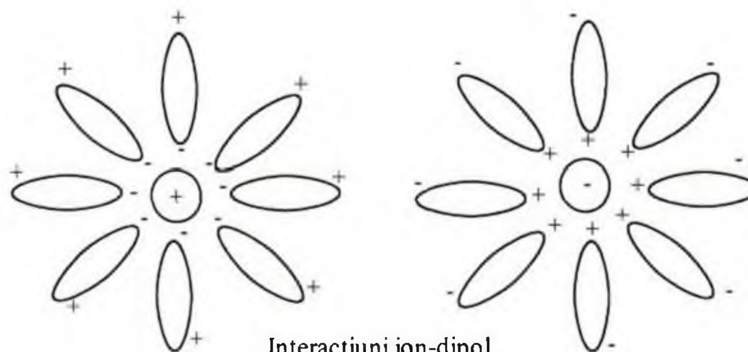
Legături de hidrogen

La distanțe reduse acționează *forțele lui Van der Waals* ce sunt determinate de atracția electrostatică a electronilor cu sarcină negativa de către un atom de nucleu încărcat pozitiv al altui atom.

Atracția între grupele electrizate determină *forțele electrostatice* și apare între sarcinile de forță mare care se află în apropiere, modificînd conformația moleculelor (COO^- și NH_3^+), (COO^- și Ca^{++}). Acest tip de *legătură dipol-dipol* este caracteristic moleculelor polare care, ajunse în contact, se influențează reciproc datorită efectelor electrostatice. Moleculele polare sub raport structural pot fi identice sau diferite. Dispunerea acestor molecule în spațiu se face ordonat cu polii de semn contrar proximitate reciprocă.


Interacțiuni dipol-dipol

Datorită forțelor de atracție electrostatice la substanțele cu molecule polare temperaturile de topire și fierbere sunt mai ridicate comparativ cu substanțele cu molecule analoage, dar nepolare. Hidratarea ionilor influențează simțitor interacțiunea electrostatică, fiindcă fiecare ion în apă e inconjurat cu un strat de molecule de apă, orientat într-un fel anumit și determinat de atracția dipolilor de apă la ionul încărcat. *Legăturile ion-dipol* se află în sisitemele în care mediul este format din molecule polare. În aceste sisteme se produce orientarea dipolilor moleculelor polare în jurul ionilor.

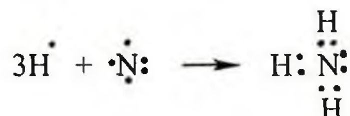

Interacțiuni ion-dipol

Fenomenul acesta este denumit ***solvatare***, iar în cazul în care moleculele polare aparțin apei este numit ***hidratare***.

Distingem și *forțe (legături) hidrofobe,* ceea ce denotă agregația grupelor nepolare. Procesul poate fi explicat ca un transfer al particulelor nepolare ale moleculei de apă în porțiunea hidrofobă. Un rol deosebit îl joacă în acest proces capacitatea pronunțată a moleculelor de apă de a se lega între ele. Un efect incontestabil al acțiunii acestor forțe se manifestă prin creșterea vădită a structurii apei - limitarea fluidității moleculelor de apă. De interacțiunea hidrofobă depinde și așa-numita *interacțiune Stacking* (forțe de instivuire), care apare între perechile de baze azotate aranjate în stive la distanța razelor Van der Waals. Aceste forțe stabilizează dublul helix de DNA.

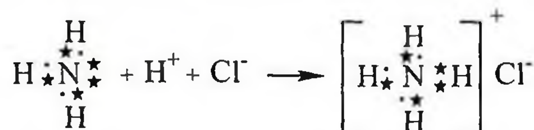
Un caz particular al legăturii covalente este *legătura coordinativă*. În cazul acestei legături dubletul de electroni puşi în comun aparţine doar unuia din atomi, denumit donator sau atom nucleofil, iar celălalt atom (legat prin acest dublet) se numeşte acceptor sau atom electrofil.

Astfel de legături pot da atomii donatori de azot, oxigen, fosfor şi sulf. În cazul azotului, acesta participă la formarea amoniacului cu trei din cei cinci electroni de valenţă:

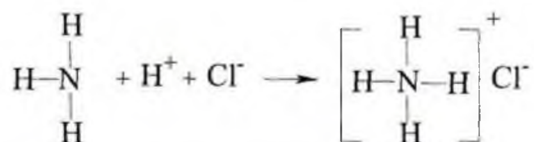


rămînînd o pereche de electroni care nu participă la formarea legăturii, pereche denumită **dublet neparticipant**.

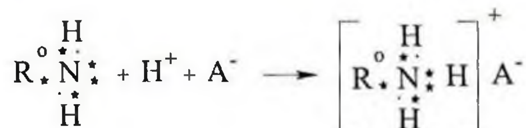
În cazul tratării unei soluţii de acid clorhidric (care este disociat în H^+ şi Cl^-) cu amoniac, ionul de H^+, neavînd o configuraţie stabilă, se ataşează dubletului neparticipant, formînd ionul de amoniu. Sarcina acestuia se echilibrează prin anionul Cl^-:



sau



Similar, în cazul interacţiunii dintre o amină ($R-NH_2$) şi un acid oarecare (AH):



sau, în redare curentă:



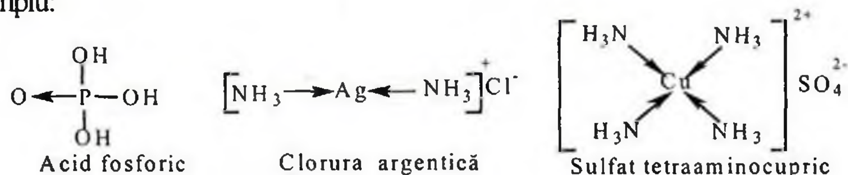
$$R-NH_2 + H^+ + A^- \longrightarrow [R-N^+H_3]A^-$$

În astfel de compuşi întîlniţi şi ca **biomolecule** există: legături covalente (în radicalul R, între acesta şi atomul de azot, între atomul de azot şi doi atomi de hidrogen); o legătură coordinativă (între atomul de azot şi atomul de hidrogen); o legătură ionică (între cationul aminic şi anionul acid A^-).

Legătura coordinativă astfel formată se mai numeşte *legătura donator-acceptor*. Ionul format se numeşte ion complex, iar combinaţia astfel rezultată se numeşte *combinaţie coordinativă.*

La notarea curentă legătura coordinativă se simbolizează printr-o săgeată orientată cu vîrful înspre atomul acceptor.

Exemplu:



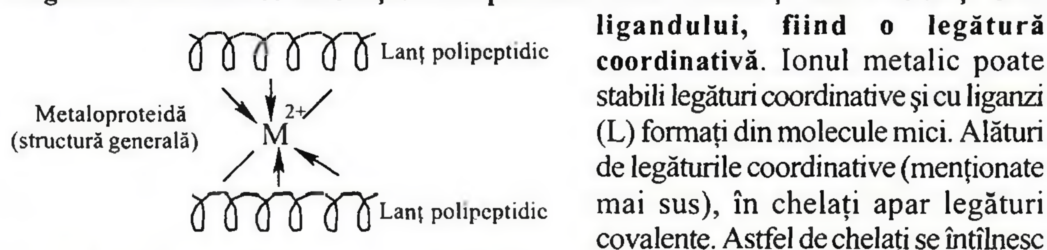
Dintre aceştia, ultimii doi compuşi sunt **combinații complexe**.

În accepția teoriei combinațiillor complexe în aceşti compuşi, se distinge un ion complex înscris între paranteze şi unul sau mai mulți ioni externi înscrişi în afara parantezei. **Ionul complex** este format dintr-un atom sau ion central, în jurul căruia se grupează mai mulți atomi, molecule neutre sau ioni (de sarcină contrară ionului central). Numărul acestora este denumit **număr de coordinație**.

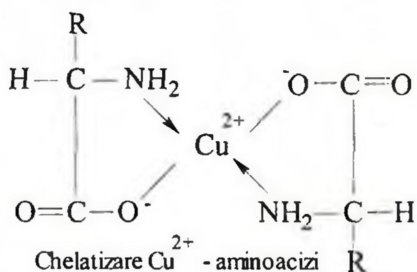
Numărul de coordinație este independent de valența atomului sau ionului central. Mai frecvent se întîlnesc numerele de coordinație 6 (Fe, Co, Cr) şi 4 (Cu, Ni), iar mai rar numerele 2 (Ag) şi 8. Combinațiile complexe sunt întîlnite şi în natură în cazul unor bioconstituenți care conțin O, P sau S.

În cazul compuşilor organometalici prezenți în sistemele biologice este întîlnită *legătura chelatică*. În astfel de legături ionii metalici (M^{n+}) stabilesc legături cu diverşi atomi din biomolecule, legătura fiind caracteristică îndeosebi proteidelor. Dintre ionii metalici, în legăturile chelatice se întîlnesc mai des ionii divalenți (Fe^{2+}, Cu^{2+}, Mn^{2+}, Zn^{2+}, Co^{2+} ş.a)

Ionul metalic formează o legătură chelatică (gr.*chela*-cleşte) în formă de «complex intern», spre exemplu, cu un aminoacid sau o catenă polipeptidică (considerați liganzi). **Legătura chelatică se stabileşte de fapt între ionul metalic şi atomi de N şi O ai ligandului, fiind o legătură coordinativă.** Ionul metalic poate stabili legături coordinative şi cu liganzi (L) formați din molecule mici. Alături de legăturile coordinative (menționate mai sus), în chelați apar legături covalente. Astfel de chelați se întîlnesc în cazul metaloproteidelor, a căror structură generală evidențiază prezența acestor legături.



Un compus chelatic, mai simplu, se formează prin legarea unui aminoacid de ionul cupric Cu^{2+}, ca rezultat al interacțiunii dintre aminoacid şi hidroxidul sau fosfatul cupric. În compusul astfel format apar legături covalente şi coordinative (reprezentate prin săgeți).



Chelatizare Cu^{2+} - aminoacizi

Se poate conchide că în materia vie pot să apară **legături de natură chimică** (covalente, ionice, de hidrogen) şi **legături de natură fizică** (legături dipol-dipol, ion-dipol, Van der Waals etc.), precum şi unele **interacțiuni complexe**, care cuprind mai multe tipuri de legături. În acest mod se formează asociațiile moleculare numite **cenapse**, vizînd grupe de substanțe cum ar fi: proteide-lipide, proteide-glucide, glucide-lipide sau chiar proteide-glucide-lipide.

CAPITOLUL I. PROTEINELE. ENZIMELE

STRUCTURA ŞI FUNCŢIA BIOLOGICĂ A PROTEINELOR

Majoritatea covîrşitoare a modificărilor biochimice în organismele vii sunt determinate de proteine: "Viaţa e nemijlocit legată de procesul de reînnoire a proteinelor şi reprezintă modul de existenţă a corpului proteic" (F. Enghels). Anume proteinele sunt constituentele chimice cu cel mai înalt grad de complexitate, varietate moleculară, care reprezintă specificitate de specie, de organ.

Denumirea de proteină provine de la cuvîntul grec *proteios*, care înseamnă *de prim rang, pentru viaţă,* folosit ca termen pentru prima dată în 1838 de către savantul german Mülder.

Proteinele formează clasa de substanţe dintre cele mai răspîndite şi de o varietate funcţională excepţională.

Proteinele îndeplinesc următoarele *funcţii fundamentale* iminente organismelor vii:

1. Au un pronunţat şi important rol structural, constituind baza structurilor celulare, membranare, precum şi a organitelor celulare, materialul intercelular al ţesuturilor şi organelor. Proteinele structurale sunt: *colagenul, elastina, keratina, fibroina*. Ele asigură diversitatea şi specificitatea de formă a tuturor fiinţelor vii.

2. Exercită cataliza fermentativă. Toate varietăţile de reacţii biochimice şi tot specificul transformărilor din organismele vii sunt determinate de enzime care sunt, de fapt, proteine. Actualmente, sunt depistate mii de fermenţi, mulţi dintre care separaţi în forma cristalică.

3. Funcţiile contractilă şi locomotoare (dinamică) sunt asigurate de proteinele respective: *actina, miozina, tubulina* - proteina microfilamentelor ce determină procesele de bază în celulă. Mişcarea coordonată la nivel microscopic (procesul mitozei) la fel e determinată de aceste proteine.

4. Funcţia de transport şi de depozitare a unor compuşi chimici ca: *ionii metalici, vitamine* etc. *Hemoglobina* aprovizionează cu oxigen ţesuturile, iar o proteină înrudită, *mioglobina,* îl depozitează în muşchi. *Transferina* şi *feritina* asigură transportul şi depozitarea fierului în sînge, ficat. *Lipoproteinele* plasmei transportă lipidele. Un grup specific de proteine se află în membrane, transferînd prin membrană în celulă diferiţi ingredienţi.

5. Funcţia de protejare faţă de corpi străini, virusuri, bacterii, macromolecule e asigurată de proteinele specifice eliminate, în majoritate, de limfocite. Reacţiile imunologice sunt determinate de imunoglobuline (proteine efectiv specifice). Astfel de proteine ca *fibrinogenul, trombina* ş. a. iau parte la procesul de coagulare a sîngelui, protejînd organismul de impactul lezării vaselor sanguine.

6. Funcţia reglatoare contribuie la reglementarea creşterii şi diferenţierii celulelor. Într-un anumit interval de timp în viaţa organismului se produce expresia numai la o parte mică din genomul celulei. Funcţia dată o îndeplinesc aşa-numitele *proteine-represor*, care inhibă porţiuni specifice în DNA celular. Aici pot fi ataşate şi proteinele ce reglează activitatea fiziologică celulară.

7. O grupă specifică de proteine poate stoca, transmite şi genera diverse mesaje chimice, impulsuri nervoase, servind drept **receptori** (*rodopsina* - proteina fotoreceptorie în retina ochiului) sau transmiţători ai impulsului nervos în sinapse etc.

8. Funcţia fizico-chimică a proteinelor e capabilă să menţină constantele sîngelui - homeostazia (albuminele determină presiunea oncotică - cantitatea, volumul lichidului în vasele sanguine).

9. Proteinele îndeplinesc şi funcţii insolite. De exemplu, sîngele peştilor antarctici conţine proteine cu proprietăţi de antigel, protejînd peştii de îngheţ. Locul de fixare a aripilor la unele insecte conţine *rizelină* - proteină purtatoare a unei elasticităţi ideale. Din plantele africane s-a extras o proteină foarte dulce - *monelina*, ce nu favorizează obezitatea, fiind folosită pe larg în raţia alimentară.

10. O grupă interesantă şi importantă o alcătuiesc proteinele alimentare şi de rezervă: *proteinele laptelui*, *ovalbumina*, *seminţele unor plante* (soe, grîu etc.), remarcîndu-se prin deosebitul lor rol energetic.

În momentul actual se studiază mii de proteine, structura şi funcţia sutelor dintre care sunt cunoscute. Astăzi deseori putem auzi despre obţinerea unor proteine noi cu funcţii excepţionale. După zeci de ani de investigaţii, un grup de savanţi de la Universitatea HARVARD (America) au obţinut (1985) o proteină pură, susceptibilă de formarea vaselor sanguine la om - *angiogenina*, compusă din 123 de aminoacizi ce constitue un singur lanţ. Folosind metodele ingineriei genetice, a fost reconstituită gena care reglează în organismul uman producerea angiogeninei. Investigaţiile prognozează sinteza unor preparate care vor ameliora circulaţia sanguină în muşchiul cardiac, contracarînd infarctul, insultul, vor contribui la cicatrizarea leziunilor, ulcerului etc. Blocada angiogeninei, însă, poate fi utilă în tratamentul cancerului, bolilor în care apar vase mici nedorite - psoriazis, rinopatie diabetică, artrită reumatoidă; la supravegherea natalităţii, preparatele contraceptive fiind inhibitori ai acestei proteine.

E uimitor faptul că toate proteinele cu diversele lor proprietăţi şi funcţii, sunt constituite din aceiasi 20 aminoacizi fundamentali, începînd cu cea mai simplă bacterie şi pîna la om. Se ştie că separat fiecare aminoacid nu are nici o funcţie biologică. Care e cauza că o proteină are proprietate catalitică, alta hormonală, cealaltă - anticorp? Prin ce se deosebesc ele din punct de vedere chimic?

Răspunsul e foarte simplu: *proteinele se deosebesc prin faptul că pentru fiecare în parte e caracteristică numai o singură secvenţă de aminoacizi. Aminoacizii sunt alfabetul structurii proteice.*

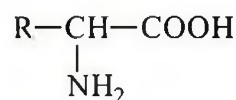
Prin legarea în lanţuri polipeptidice, variate ca lungime şi succesiune a unităţilor, se poate obţine un număr infinit de îmbinări de compuşi. Fiecare specie conţine mii de proteine, dar specii există circa 10 milioane. Putem oare asigura aceste proteine numai cu 20 aminoacizi? O analiză matematică simplă arată că pentru un polipeptid din 20 aminoacizi diferiţi, nici unul dintre care nu se repetă măcar de 2 ori, numărul de variaţii este de 20x19x18 ş.a.m.d., ~ $2x10^{18}$. Masa moleculei e de 2600 Da.

Dar dacă luăm o proteină cu masa de 34000 Da, unde 12 aminoacizi sunt reprezentaţi în acelaşi raport, atunci căpătăm 10^{300} de combinaţii. Dacă în componenţa lor vor fi incluşi 20 aminoacizi în acelaşi raport, numărul va creşte enorm. Dacă ar exista numai

cîte o moleculă din fiecare proteină posibilă, apoi greutatea lor ar fi mai mare decît a planetei noastre. Variaţii din aceşti 20 aminoacizi pot fi atît de multe, încît ar fi suficiente nu numai pentru proteinele existente azi, dar şi pentru cele care vor apare în viitor. Potrivit calculelor specialiştilor, azi pe pămînt există 0,001 de specii dintre cele cunoscute cîndva.

Unitatea structurală de bază a proteinelor sunt *aminoacizii*.

Primul aminoacid descris în 1806 a fost asparagina, iar ultimul - treonina - a fost identificat de abia în 1936. Fiecare aminoacid are denumirea sa tradiţională (conform originii lui), raţională (chimică), abreviere din trei litere şi simbol de o literă. Aminoacizii sunt derivaţii acizilor graşi saturaţi-aminoderivaţi. Au o structură în care, cu acelaşi atom de carbon este legată grupa carboxilică şi aminică.



Aminoacizii se deosebesc între ei prin natura acestui radical (R).

Anume radicalul R la diferiţi aminoacizi diferă după structură, sarcină electrică, solubilitate în apă.

După proprietatea de a interacţiona cu H_2O la un pH = 7,0, deosebim 4 grupe de aminoacizi (tab.1.1):

1. Aminoacizi cu radicali *hidrofobi, nepolari* - hidrocarburi. Reprezentanţi: *alanina, valina, leucina, izoleucina, prolina, metionina, fenilalanina, triptofanul.*

2. Aminoacizii cu radicali *polari*, dar fără sarcină electrică. Ei formează legături de hidrogen cu molecule de H_2O. Reprezentanţi: *serina, tirozina, treonina* - polaritatea e determinată de grupa OH^-; *asparagina şi glutamina* - de grupa NH_2; *cisteina* - de SH, iar la *glicină* - radicalul (H) ce nu compensează polaritatea grupelor NH_2 şi COOH.

3. Aminoacizii cu radicali *încărcaţi negativ* (*acidul aspartic şi glutamic*).

4. Aminoacizii cu radicali *încărcaţi pozitiv* (*lizina, arginina - grupa guanidinică şi histidina - grupa imidazolică*).

În structura unor proteine se remarcă şi aminoacizi nefundamentali în componenţa colagenului: *4-hidroxiprolină, 5-hidroxilizină*; în miozină - *metillizină*; în protrombină - *acidul carboxiglutamic*; în elastină - *desmozină* formată din 4 molecule de lizină. Aceşti aminoacizi se mai numesc *aminoacizi minori* (tab.1.2).

Se mai întîlnesc aminoacizi cu alte funcţii ca: *ornitina, citrulina, β-alanina,* etc. (tab.1.2).

Solubilitatea aminoacizilor în apă este influienţată de prezenţa sărurilor. Cea mai mică solubilitate în apă o au cistina şi tirozina (0,04 g/100 g a.d.), mult mai mare - prolina şi oxiprolina (154 g/100 g a.d.). Foarte solubili sunt arginina, lizina şi cisteina la pI în apă distilată şi 20°C (tab.1.3). Prolina este singurul aminoacid cu o solubilitate bună în alcool, ceilalţi aminoacizi se dizolvă foarte greu. Toţi aminoacizii sunt uşor solubili în soluţii slab acide sau alcaline. De remarcat că triptofanul pur în soluţii acide este stabil, în timp ce în amestecuri sau în hidrolizate proteice uşor se oxidează.

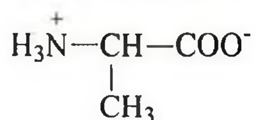
Toţi aminoacizii fundamentali, cu excepţia glicinei, posedă un *carbon asimetric (centru chiralic)* care este Cα (excepţie prezintă izoleucina şi treonina care au 2 centre chiralice Cβ (2 x 2 = 4)).

Formulele de configuraţie ale enantiomerilor unui aminoacid oarecare, repre-

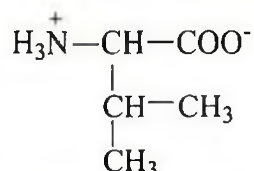
Tabelul 1.1 ***Structura şi denumirile aminoacizilor proteinogeni***

1.Grupa acizilor hidrofobi nepolari.

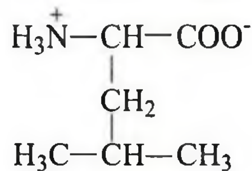
Alanina (Ala) A
Acid α-aminopropionic



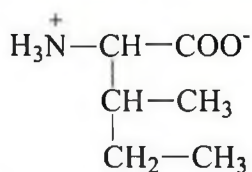
Valina (Val) V
Acid α-aminoizovalerianic



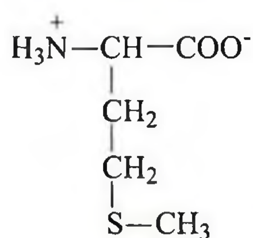
Leucina (Leu) L
Acid α-aminoizocapronic



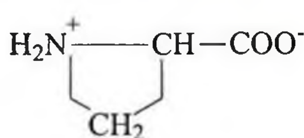
Izoleucina (Ile) I
Acid α-amino-β-metilvalerianic



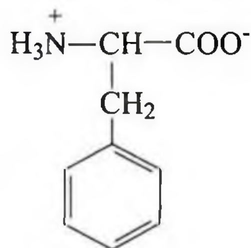
Metionina (Met) M
Acid α-amino-S-metiltiobutiric



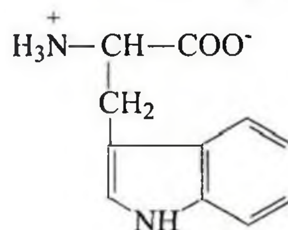
Prolina (Pro) P
Acid pirolidin-α-carboxilic



Fenilalanina (Phe) F
Acid α-amino-β-fenilpropionic

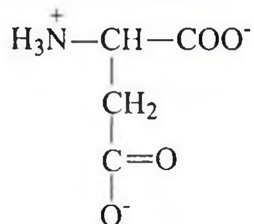


Triptofan (Trp) W
Acid α-amino-β-indolilpropionic

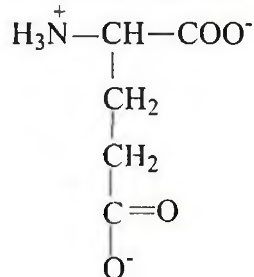


2.Grupa acizilor cu sarcină negativă.

Acid aspartic (Asp) D
Acid aminosuccinic

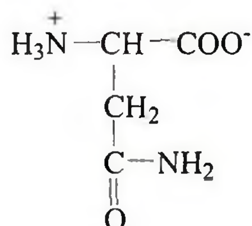


Acid glutamic (Glu) E
Acid α-aminoglutaric

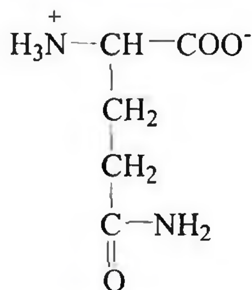


3. Grupa acizilor hidrofili

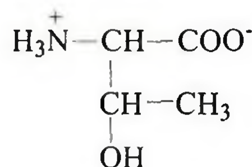
Asparagina (Asn) N
Acid α-amino-
β-amidosuccinic



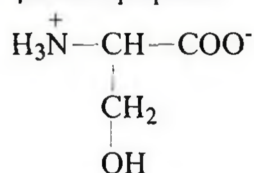
Glutamina (Gln) Q
Acid α -amino-
γ -amidoglutaric



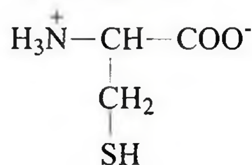
Treonina (Thr) T
Acid α-amino-
β-hidroxibutiric



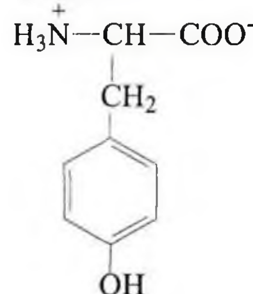
Serina (Ser) S
Acid α-amino-
β-hidroxipropionic



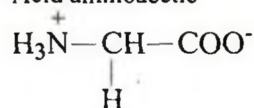
Cisteina (Cys) C
Acid α-amino-
β-tiopropionic



Tirozina (Tyr) Y
Acid p-hidroxifenil-
alaninic

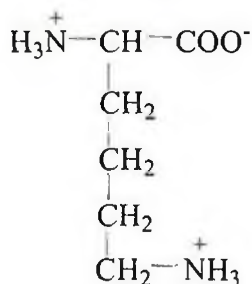


Glicina (Gly) G
Acid aminoacetic

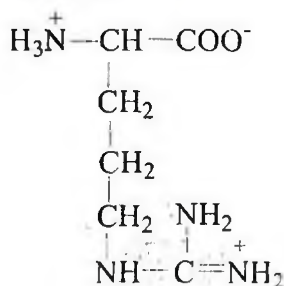


4. Grupa acizilor cu sarcină pozitivă.

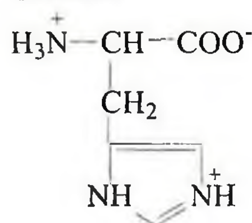
Lizina (Lys) K
Acid α,ε-diaminocapronic



Arginina (Arg) R
Acid α-amino–δ–guanidino
valerianic

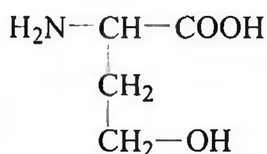


Histidina (His) H
Acid α-amino–β–imidazolil
propionic

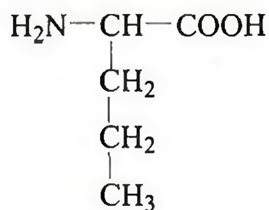


Tabelul 1.2 *Aminoacizii neproteinogeni*

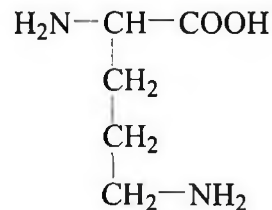
Homoserina
acid α - amino-
γ -hidroxibutiric



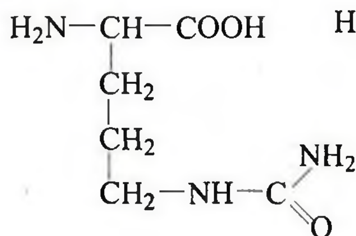
Norvalina
acid α-aminovalerianic



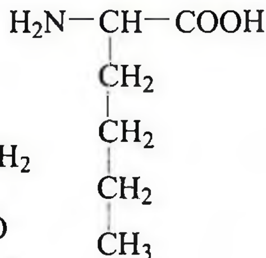
Ornitina
acid α, δ -diaminovalerianic



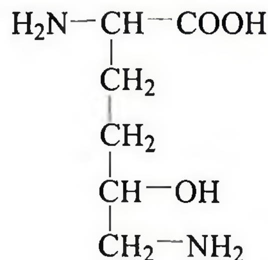
Citrulina
acid α - amino-
δ -carbamilovalerianic



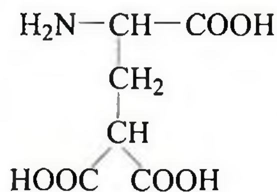
Norleucina
acid α-aminocapronic



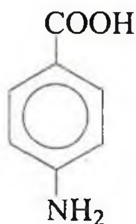
Hidroxilizina
acid α,ε - diamino-
δ -hidroxicapronic



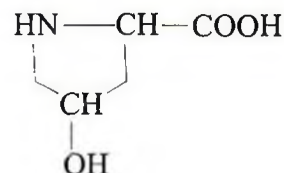
Acid γ-carboxiglutamic



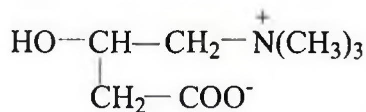
Acid p - aminobenzoic



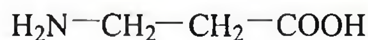
Hidroxiprolina
acid pirolidin-γ - hidroxi-
α - carboxilic



Carnitina

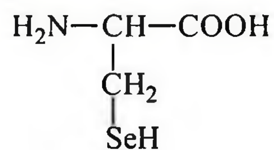


β–Alanina
acid β-aminopropionic

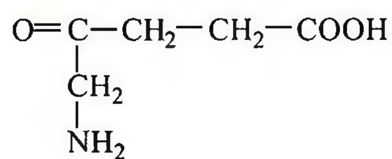


Tabelul 1.2 (continuare)

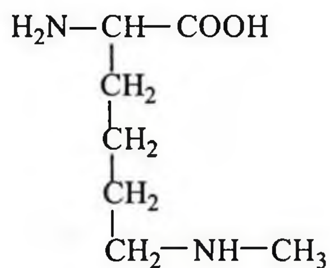
Selenocisteina



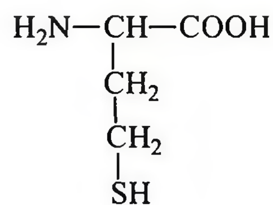
Acid δ - aminolevulinic



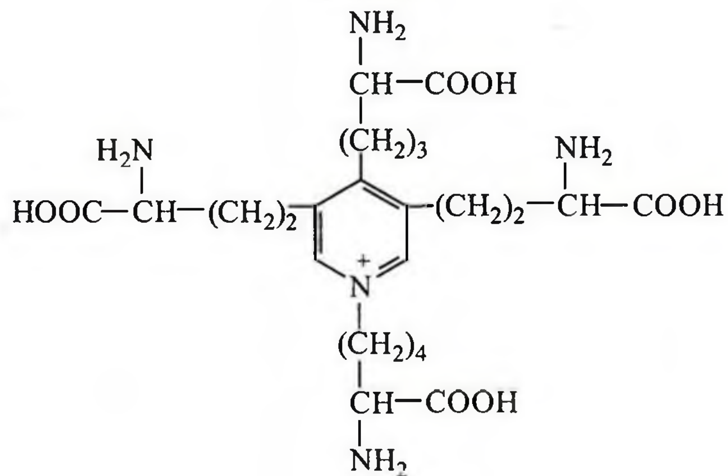
Metillizina



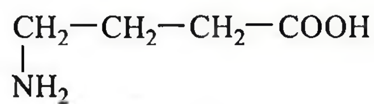
Homocisteina
acid α - amino-
γ - tiobutiric



Desmozina



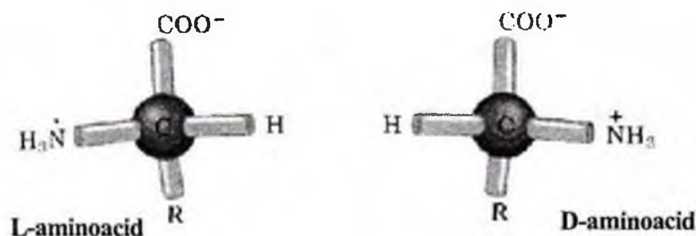
Acid γ - aminobutiric, GABA



Tabelul 1.3 ***Solubilitatea în apa distilată (g/g) la pI specific şi 20°C***

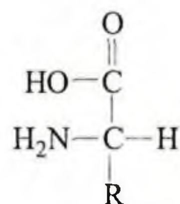
Aminoacid	Solubilitate (g /100 g a.d.)	Aminoacid	Solubilitate (g /100 g a.d.)
Alanina	22,50	Leucina	3,60
Arginina	f. solubil	Lizina	f. solubil
Asparagina	2,40	Metionina	3,00
Acid aspartic	0,40	Prolina	154,50
Cisteina	f. solubil	Serina	4,30
Fenilalanina	2,70	Treonina	1,60
Glicina	4,00	Triptofan	1,10
Glutamina	3,60	Tirozina	0,04
Acid glutamic	3,70	Valina	6,80
Histidina	4,00		

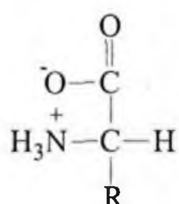
zentate în sistemul D-L, în care substanţa de referinţă este aldehida glicerică dextrogiră, sunt redate în felul următor.



Literele se referă numai la configuraţia absolută: în cazul D-izomerului gruparea NH_2 se află în dreapta, iar a L-izomerului - în stînga. În structura proteinelor se întîlnesc numai L - aminoacizi, doar pentru ei există sisteme enzimatice, care prezintă specificitate de substrat, graţie căreia se asigură metabolizarea lor.

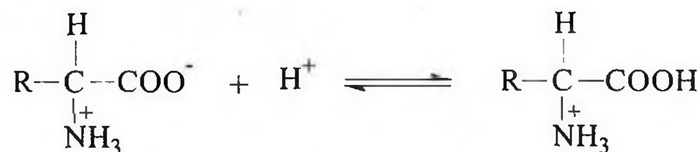
La valori de pH neutre aminoacizii în soluţie se află în formă de *ioni bipolari* (Zwitterion). Grupa amină e protoionizată (NH_3^+), iar cea carboxilică (COO^-) - disociată.



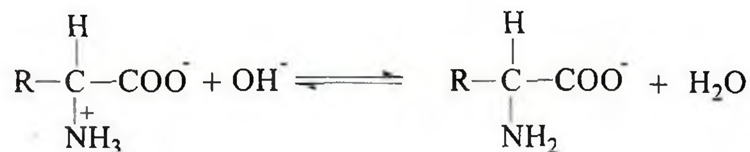


Forma neutră   Forma de ion bipolar (amfiion)

Ionizația aminoacizilor depinde de valorile pH. În soluții acide grupa COOH este neionizată, iar cea amină - ionizată (NH_3^+).



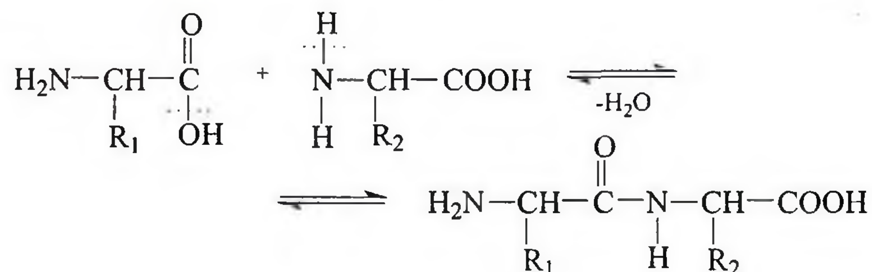
În soluții bazice situația e contrară, ionizată e grupa carboxilică (COO^-).



În arhitectonica moleculei proteice deosebim patru niveluri structurale.

STRUCTURA PRIMARĂ

Cum se leagă aminoacizii în proteine? Procesul decurge în felul următor: α-grupa carboxilică a unui aminoacid se unește cu α-aminogrupa altui aminoacid, formînd *legătura peptidică*, cu eliberarea unei molecule de apă.

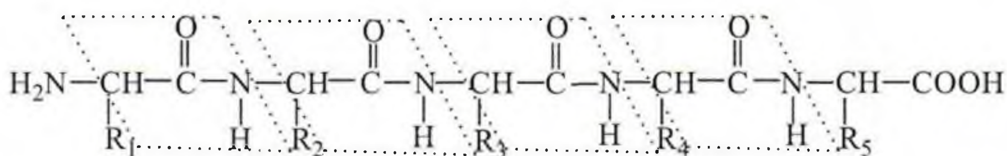


Echilibrul acestei reacții înclină mai mult spre procesul de hidroliză, dar nu de sinteză.

De aceea procesul de sinteză necesită energie, pe cînd hidroliza decurge cu degajarea ei. La unirea multor aminoacizi cu legăturile peptidice se formează un lanț (catenă) polipeptidic, avînd o structură liniară.

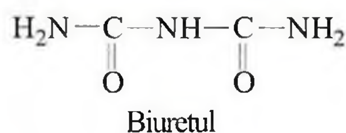
Lanțul are o anumită direcție. S-a stabilit condițional că el începe cu capătul purtător de aminogrupă, capătul N. Descrierea unei secvențe de aminoacizi în lanț începe anume de la acest capăt terminal. Aminoacidul, care în legătura peptidică participă cu grupa sa COOH, capătă sfîrșitul - il; aminoacidul final, care conține grupa COOH liberă, nu-și schimbă denumirea, formînd capătul C - terminal.

Așadar, lanțul polipeptidic are un schelet cu o structură strictă, repetată și catene laterale diferite.



Succesiunea aminoacizilor determină *structura primară* a proteinelor, fiind baza informației genetice. În unele proteine catenele laterale se unesc între ele cu legături disulfidice, care se formează la oxidarea resturilor de cisteină. Alte legături covalente în structura proteinelor nu se întîlnesc. Astfel de tip de legătură între aminoacizi în molecula proteică l-a stabilit, în 1888, savantul rus A. Danilevschi; dar numai în 1902 E.Fischer a înaintat *teoria polipeptidică*. Azi știința posedă argumente convingătoare ale prezenței acestei structuri:

1. Analiza roentgenostructurală a permis determinarea tabloului repartiției resturilor de aminoacizi în lanțul polipeptidic și conformația lui.



Biuretul

2. Argumentarea de bază este posibilitatea de sinteză a proteinelor purificate, precum și a polipeptidelor cu structură cunoscută, care posedă activitate biologică, la fel ca și proteinele native.

3. Proteinele, ca și compusul *biuret*, dau o colorație albastră-violetă în prezența $CuSO_4$, în mediu alcalin, ceea ce e o dovadă a prezenței legăturii peptidice.

Fiecare proteină are o structură unică, o succesiune precisă de aminoacizi. În 1953, Frederic Sanger descifrează aminoacizii în lanțurile polipeptidice ale hormonului - insulină. Prima dată a fost determinată succesiunea aminoacizilor, stabilindu-se că aceasta e determinată genetic. Sinteza tuturor proteinelor din aminoacizi are mecanism similar.

Care este necesitatea determinării acestor succesiuni în proteine?

Avem posibilitatea de a stabili:

1. Baza moleculară a activității biologice a proteinelor.

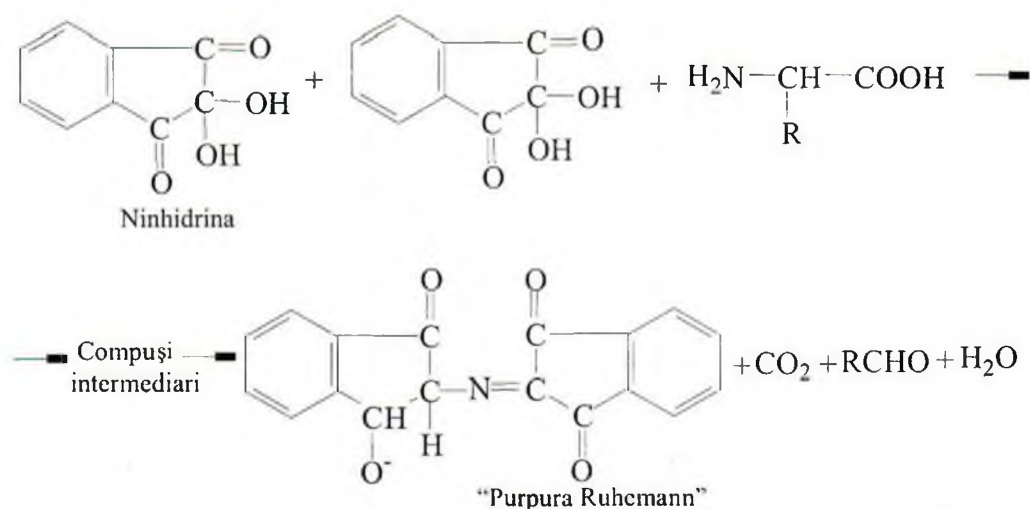
2. Principiile ce stau la baza formării lanțului polipeptidic - la acțiunea biologică activă alcătuesc structuri specifice bazale.

3. Modificările în succesiunea aminoacizilor pot conduce la tulburări ale funcției proteinelor și, în consecință, la apariția maladiilor. De menționat că modificarea unui singur aminoacid provoacă tulburări grave în metabolism. Evoluează o direcție nouă în medicină - *patologia moleculară*.

4. Succesiunea resturilor de aminoacizi furnizează informații sugestive despre evoluția procesului la nivel molecular.

Care sunt principiile de descifrare a succesiunii aminoacizilor?

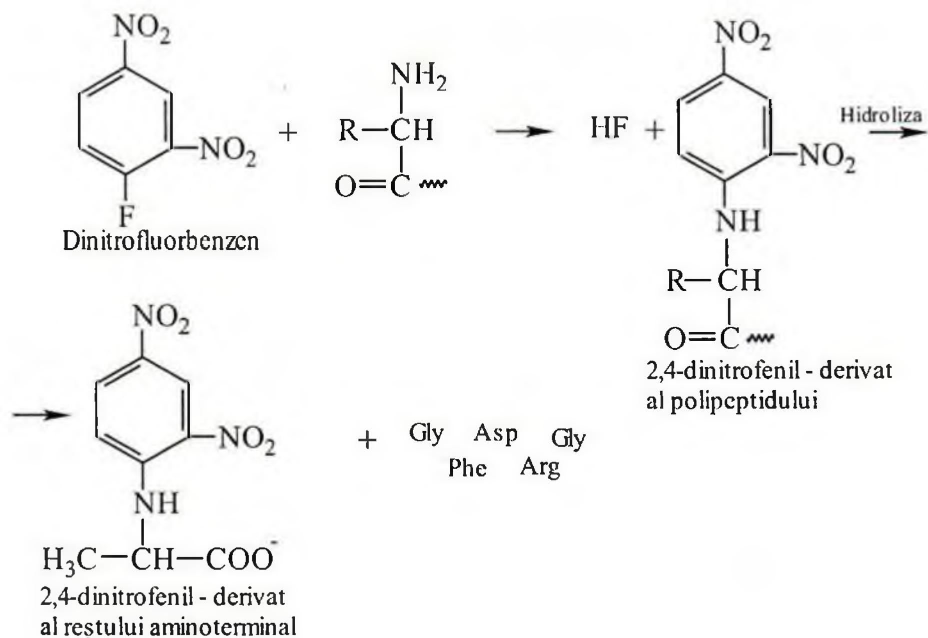
1. Proteina trebuie să fie hidrolizată pînă la aminoacizi, încălzind-o la 110°C timp de 24 ore în 6 N HCl. Hidrolizatul e separat prin metoda cromatografiei ionice cu polisterol sulfonizat. Aminoacizii fracționați se determină prin reacția cu *ninhidrină*: α-aminoacizii conferă o culoare albastră intensivă, prolina (iminoacid) - galbenă.



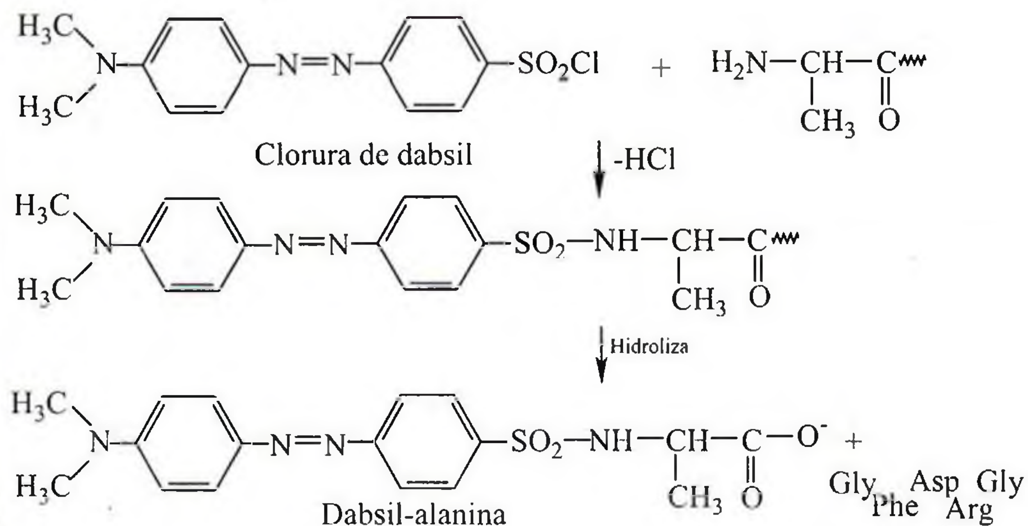
Metoda aplicată este deosebit de efectivă. Cantitatea de aminoacizi e proporțională densității optice a soluției după încălzire cu ninhidrină.

Dacă cantitatea de aminoacizi este minimă, se folosește *fluorescamina*. Comparînd rezultatele obținute cu amestecul standard, determinăm compoziția aminoacidică a proteinei și anume: compoziția, nu însă succesiunea aminoacizilor.

2. Procedeul de identificare a terminalelor N și C a fost utilizat de F. Sanger *pentru stabilirea grupei* NH_2 de către *dinitrofluorbenzen*, ce reacționează cu NH_2, formînd compuși (de culoare galbenă) ai acestei substanțe. Legătura e stabilă și se păstrează la hidroliza legăturii peptidice; compusul e determinat cromatografic.



Atunci cînd aminoacizii constituie cantități mici, e folosit un alt reagent - *clorura de dabsil*, care, reacționînd cu grupa NH_2, conferă compusului sulfamidic o culoare intensivă, fluorescentă.



Determinarea capătului N-terminal prin marcarea cu clorură de dabsil

Resturile C - terminale ale catenelor polipeptidice se identifică în felul următor: polipeptida se incubează cu carboxipeptidaza (COP), care hidrolizează legătura peptidică la capătul C-terminal, compusul fiind determinat cromatografic. Carboxipeptidaza-A este inactivă la COOH ale argininei, lizinei şi prolinei. Carboxipeptidaza-B scindează COOH ce aparţine lizinei şi argininei.

Metoda chimică: proteina se incubează cu hidrazină la 100°C, în lipsa apei, rezultă hidrazide ale aminoacizilor, excluzînd COOH-terminal, care rămîne liber. Acest aminoacid este identificat cromatografic.

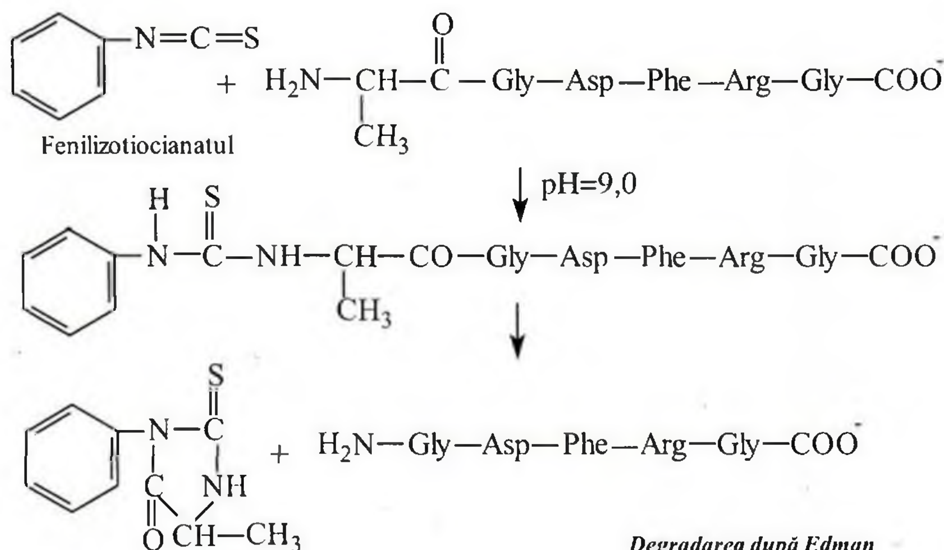
Un alt principiu constă în **scindarea lanţului polipeptidic în fragmente**, explorînd diferite metode:

a) hidroliza catalitică limitată sub acţiunea enzimelor specifice - *tripsina* (scindează legăturile peptidice formate de grupa COOH a Lys şi Arg, indiferent de lungimea şi succesiunea aminoacizilor în lanţ);

b) metode chimice specifice, de exemplu, *bromura cianidică* (CNBr) scindează legătura peptidică formată de COOH a metioninei. Această metodă e prea dificilă.

Peri Edman propune **metoda de determinare a succesiunii fragmentelor peptidice sau aminoacizilor**. În metoda elaborată de F.Sanger hidrolizatul nu poate fi folosit dublu din cauza că peptida se hidrolizează complet.

Peri Edman a reuşit să marcheze capătul N-terminal şi scindarea lui de la peptid, producîndu-se fără scindarea altor legături peptidice. Metoda constă în scindarea fiecărui rest de aminoacid din capătul N-terminal. În acest caz se foloseşte fenilizotiocianatul care reacţionează cu NH_2, rezultînd formarea feniltiohidantoina compusului:

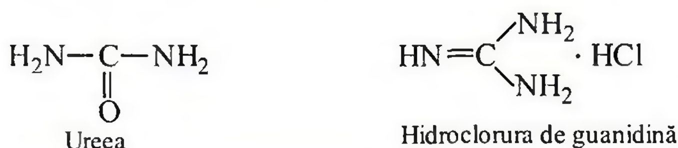


Degradarea după Edman

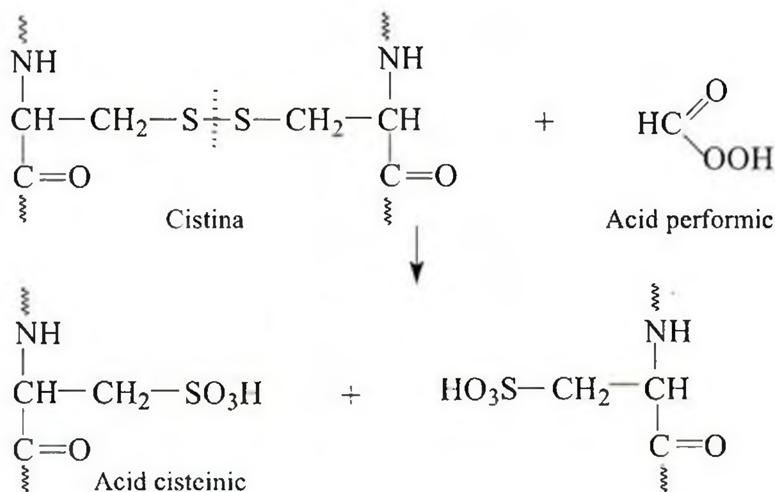
În mediu slab acid are loc disocierea compusului ciclic, iar peptida rămasă e mai mică cu un rest de aminoacid. Produsul este identificat cromatografic. Degradarea după Edman este repetată.

În fine, se ajunge la etapa în care succesiunea în fragmente de peptide e clară, dar nu e identificată succesiunea peptidelor înseşi. Ultimele se determină după suprapunerea diferitelor segmente de peptide, stabilindu-se astfel segmentele de coincidenţă. Se folosesc şi alţi fermenţi ca: *chimotripsina* (scindează legătura peptidică formată de COOH a Phe, Tyr şi Trp), *pepsina* etc.

Metodele descrise mai sus se referă la proteinele compuse dintr-un singur lanţ polipeptidic, fără prezenţa legăturilor disulfidice. În caz contrar, sunt necesare metode suplimentare. Disociaţia a mai multor catene polipeptidice e posibilă sub acţiunea detergenţilor ca: *ureea, hidroclorura de guanidină*, care scindează legăturile necovalente, distrugînd structura terţiară şi cuaternară.



Legăturile disulfidice se rup la oxidarea în acid performic, cu formarea resturilor de acid cisteinic.



Analiza structurală a proteinei poate fi accelerată prin utilizarea secvenţiatorului - aparat ce permite determinarea automată a succesiunii de aminoacizi.

Proprietăţile funcţionale ale proteinelor sunt determinate de conformaţie, aranjamentul spaţial al atomilor, esenţială fiind succesiunea de aminoacizi, care, de fapt, şi stabileşte conformaţia proteinei.

La sfîrşitul anilor 1930 L.Pauling şi R.Corey au început explorarea structurii aminoacizilor şi a peptidelor cu raze X şi au determinat lungimea şi unghiul standard ale legăturilor, ca apoi să prevestească conformaţia proteinei. S-a constatat un fapt important, şi anume: unitatea peptidică posedă o structură planică rigidă. Atomul de hidrogen al grupei NH_2 ocupă o poziţie trans în raport cu O_2 a grupei carbonilice (fig. 1.1).

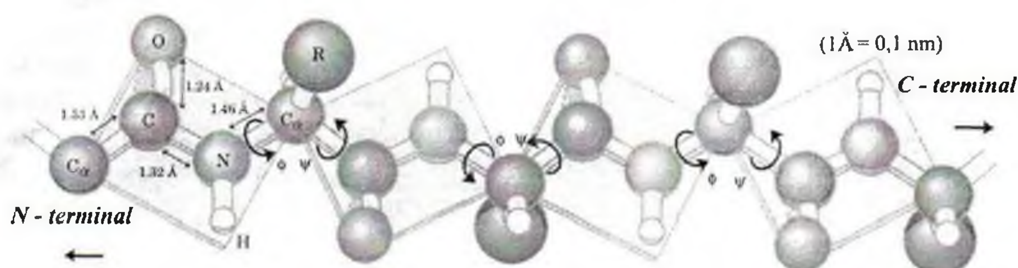
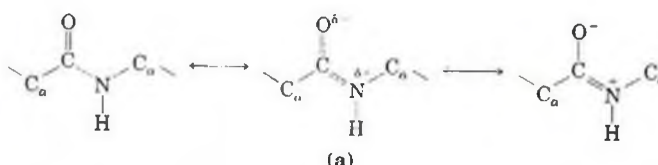


Figura 1.1. ***Grupa peptidică cu lungimea legăturilor***

Legătura dintre carbonul grupei carbonilice şi azotul grupei NH din legătura peptidică posedă un caracter parţial de legătură dublă.



Şi, deci, rotirea în jurul acestei legături este îngreuiată. Lungimea ei este de 1,32Å, media lungimii dintre legăturile ordinare C-N şi legătura dublă C=N. Spre deosebire de cazul examinat, legătura dintre atomul de C şi atomul de C al grupei carbonilice este ordinară. Prin urmare, în ambele părţi ale legăturii peptidice rigide gradul rotirii libere este foarte mare. Fiecare aminoacid e caracterizat prin unghiurile sale de rotire. Rotirea faţă de aceste legături se notează prin unghiurile ψ şi ϕ (fig. 1.2).

În concluzie, *structura primară nu este altceva decît succesiunea de aminoacizi în proteină şi localizarea punţilor disulfidice.* Ea reprezintă o caracteristică completă a legăturilor covalente din proteină.

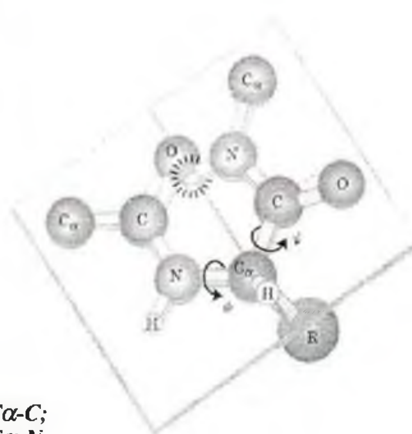


Figura 1.2. ***Determinarea unghiurilor ψ şi ϕ***
ψ - caracterizează rotirea faţă de legătura ordinară Cα-C;
ϕ - caracterizează rotirea faţă de legătura ordinară Cα-N

STRUCTURA SECUNDARĂ se obţine în rezultatul interacţiunii sterice a resturilor de aminoacizi localizaţi alături în succesiunea liniară.

Unele dintre aceste interacţiuni au un caracter reglementat, generînd astfel o anumită periodicitate. Drept exemplu ne serveşte α-elicea, structura β sau structura în foaie plisată şi spirală de colagen. E posibil oare ca lanţul polipeptidic să obţină o structură din porţiuni repetabile?

L.Pauling şi R.Corey, studiind un şir de conformaţii potenţiale, au elaborat modele moleculare exacte - una din structurile secundare mai des întîlnite şi dintre cele mai avantajoase, luînd în considerare rigiditatea geometrică a legăturii peptidice şi variaţiile de unghi admisibile, se dovedeşte a fi *α-elicea* (fig. 1.3).

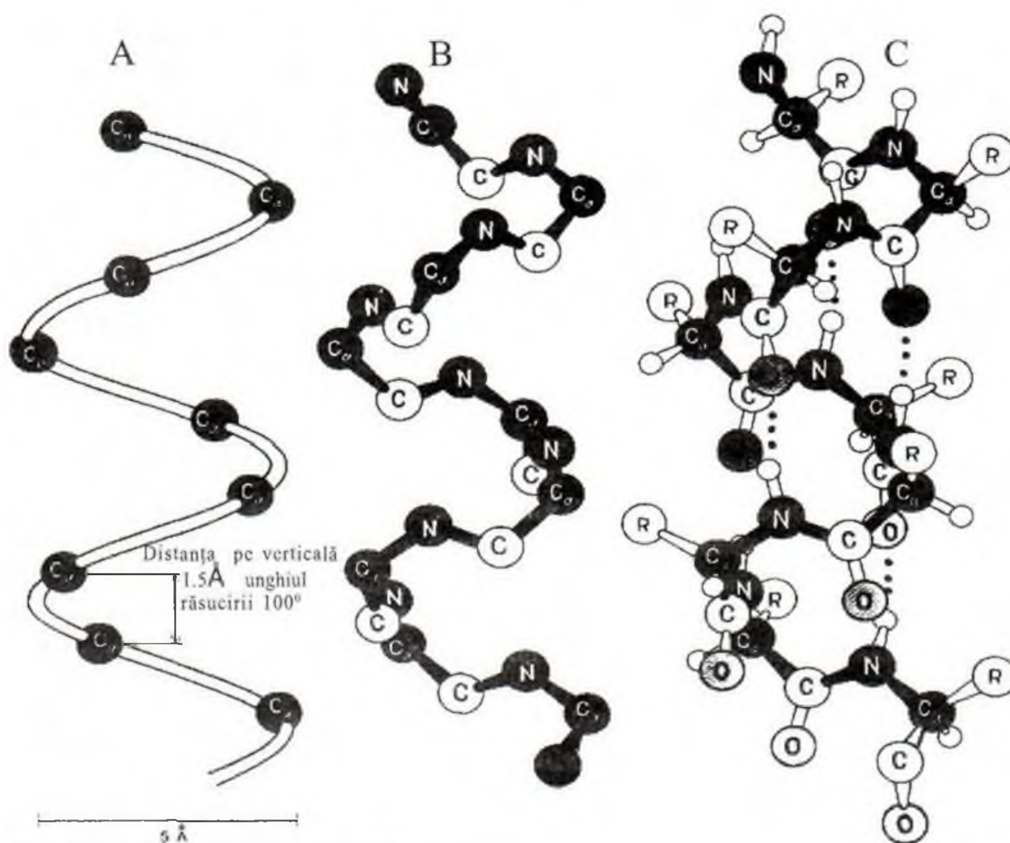


Figura 1.3. ***Modelul α -elice orientată spre dreapta***
A - sunt prezentaţi în elice numai atomii Cα;
B - sunt atomii de azot (N) ce formează scheletul moleculei; atomii Cα şi carbonul carbonilic - C;
C - spirala completă, prin puncte sunt reprezentate legăturile de hidrogen între NH şi CO grupe, ce stabilizează spirala

Spirala are forma unui cilindru, răsucit tensionat, lanţul de bază formează partea internă a cilindrului, iar radicalii (lanţ exterior) sunt orientaţi spre exterior, mişcîndu-se conform spiralei. Spirala este stabilizată de legăturile de hidrogen dintre NH şi CO, grupe ale lanţului de bază. Grupa CO a fiecărui aminoacid se reuneşte prin legătura de hidrogen cu NH, grupa aminoacidului situat în succesiune liniară cu patru resturi în

avans. Deci, toate grupele CO şi NH ale lanţului de bază sunt unite între ele prin legături de hidrogen. Pasul elicei conţine 3,6 resturi de aminoacizi, adică aminoacizi separaţi în succesiuni liniare de 3 - 4 resturi de aminoacizi, fiind amplasaţi foarte aproape în structura spiralei. Dimpotrivă, aminoacizii aflaţi la două resturi diferenţă unul de altul, spaţial sunt plasaţi opus unul faţă de altul şi, deci, interacţiunea reciprocă devine imposibilă. Pasul spiralei este de 5,4Å (angström, unitate de lungime echivalentă cu 0,1 nm, denumită astfel în cinstea savantului spectroscopist A. Angström). La fiecare rest, aminoacidul avansează pe verticală cu 1,5Å. Diametrul acestui bastonaş în care se află atomul C-α este de 10Å. Sensul răsucirii lanţului polipeptidic poate fi atît de la stînga la dreapta, cît şi viceversa. Toate cercetările α-elicei proteinelor se referă la primul tip.

Cota α-elicei în proteinele studiate pînă acum este imens de variabilă. În unele proteine, de exemplu mioglobina şi hemoglobina, α-elicea stă la baza acestor structuri, însă proteina chimotripsina e lipsită de ea complet. Elicele formează unele elemente proteice lungi, ajungînd la mai mult de 1000Å. Două şi mai bine spirale pot să se rasucească ca firele în frînghie groasă. Astfel de structură se numeşte superspirală şi o găsim în diferite proteine ca: miozina, keratina, tropomiozina, fibrina şi în alte proteine sanguine etc. Asemenea structuri îndeplinesc un rol mecanic, formînd fibre, şi sunt caracteristice pentru proteinele fibrilare. L.Pauling cu R.Corey au prezis această structură cu 6 ani înainte de a fi experimental depistată prin metoda analizei R-structurale. A fost descoperită o eră nouă în biologia moleculară, favorizînd posibilităţi de a prezice conformaţia lanţului polipeptidic, în cazul în care sunt explorate proprietăţile ingredientelor.

Însă nu toate polipeptidele sunt capabile să formeze spirale. Există aminoacizi dezorganizatori ai elicei în structura primară. Aceste resturi de aminoacizi împiedică sau diminuează tendinţa de răsucire elicoidală a unui lanţ polipeptidic. S-a stabilit că:

1. Prezenţa prolinei întrerupe răsucirea elicoidală a lanţului polipeptidic. Atomul de azot se include în componenţa inelului rigid din structura aminoacidului, ce exclude orice rotire cît de mică în jurul legăturii N-C. Atomul de azot care formează legătura peptidică n-are atom de hidrogen şi de aceea el nu-i capabil să formeze legături de hidrogen intracatenare. În consecinţă, structura spiralică se dereglează întotdeauna acolo unde e prezent acest aminoacid, formîndu-se un cot, o îndoire, o încovoiere în lanţ.

2. Dacă în succesiunea aminoacizilor sunt alăturate multe resturi de acid glutamic, apoi la pH = 7 apare o forţă de respingere între grupele carboxilice încărcate negativ, forţa cărora e mult mai mare decît forţele stabilizatoare ale punţii de H a spiralei. Din aceeaşi cauză segmentul de catenă, cu un număr mare alăturat de resturi ale aminoacizilor ca lizina sau arginina, cu o sarcină pozitivă, nu va avea formă elicoidală.

3. Resturile unor aminoacizi (valina, serina, treonina, izoleucina, asparagina), avînd radicali voluminoşi la C-α, conferă o oarecare strîngere sterică a elicei, servind drept factori destabilizatori (grupa OH a serinei, treoninei pot forma punţi de H). La fel vor reacţiona şi resturile de cisteină, care formează punţi disulfidice covalente. Ele vor lega rigid poziţiile lanţurilor polipeptidice şi în vecinătatea acestor regiuni răsucirea elicoloidală nu mai poate avea loc.

Rezultă că avem 4 tipuri de limitări care influenţeaza asupra conformaţiei catenei polipeptidice:

1. rigiditatea legăturii peptidice;
2. forțele electrostatice de respingere sau atragere, dacă aminoacizii le au în apropiere;
3. prezența radicalilor voluminoşi;
4. prezența iminoacidului - prolina.

S-a stabilit că structura primară constă în succesiunea aminoacizilor în lanț, legăturile covalente peptidice aparținînd catenelor. Structura secundară se caracterizează prin conformația în spațiu a resturilor de aminoacizi în lanțul polipeptidic. Exemplu clasic de α - spirală e α -spirala keratinei ce conține multă cisteină. După cantitatea de Cys se evidențiază keratina diferitelor surse. La broasca țestoasă, de exemplu, conținutul de Cys este egal cu 18%. Carapacea ei nu numai că are o duritate excelentă, dar în condiții fiziologice e insolubilă în apă. Globulinele şi mai ales albuminele datorită solubilității lor în apă, permit formarea unei soluții de 60%.

Care-i cauza acestei deosebiri? *α-keratinele* conțin aminoacizi care au grupe hidrofobe localizate pe suprafața exterioară a elicei, ce ocupă o poziție fixată şi sunt orientate spre faza apoasă. În proteinele globulare de asemenea avem grupe hidrofobe, dar ele sunt camuflate, n-au contact cu apa, iar pe suprafața exterioară sunt ataşate grupe hidrofile sau polare.

În acelaşi an L. Pauling şi R. Corey au descris o altă variantă de structură periodică - aşa-numita *β-structură sau structura în foaie plisată* (fig. 1.4).

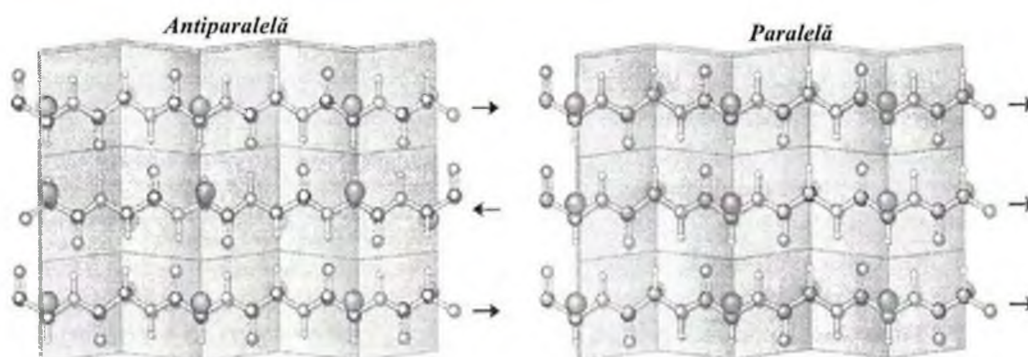


Figura 1.4. *β– structură*

Ea se deosebeşte de α -spirală prin:

1. Formă plată, dar nu de bastonaş, în fibroină, de exemplu, catenele polipeptidice sunt localizate paralel una față de alta, formînd plise şi de aceea astfel de structură se numeşte foaie plisată sau de straturi. Fibroina conține 100 %, iar alte proteine - proporții variate de asemenea structuri.

2. Distanța între două resturi de aminoacizi e de 3,5E (nu de 1,5 ca la α-spirală). Structura-β e stabilizată prin punți de hidrogen intercatenare, dar nu intracatenare ca la α-spirală. Radicalii de aminoacizi ies în ambele părți ale structurii-β.

Există *α şi β-keratinele*. În β nu se formează punți disulfidice între catene, lanțurile fiind direcționate diferit - antiparalel. Structura β, la rîndul ei, e determinată de secvența de aminoacizi în lanțul polipeptidic. O condiție obligatorie e ca resturile de aminoacizi să

posede grupe mici. Aşadar, în fibrinoina mătasei majoritatea acestor resturi revine glicinei şi alaninei. Fiecare al doilea aminoacid e glicină. β-keratinele aparţin tot proteinelor fibrilare insolubile în apă, dar sunt mai flexibile şi mai greu se extind. Periodicitatea structurii se repetă peste 7Å.

Aceste concluzionări rezultă din urmatoarele experimentări:

Dacă α-keratina părului este prelucrată cu unele substanţe şi apoi supusă acţiunii aburilor, ea se extinde aproape de 2 ori faţă de lungimea iniţială. Radiograma acestei stări e caracteristică fibroinei, adică îşi pierde α-elicea şi capătă β-structura, ca rezultat al ruperii legăturilor de hidrogen, ce stabilizau α-spirala. Dacă α-keratina se răceşte şi se ia greutatea respectivă, apoi automat se reîntoarce la conformaţia de α -spirală. Procesul e cauzat de faptul că în α-elice radicalul grupelor este mai mare decît în β -structură şi de aceea ultima conformaţie în astfel de compuşi e mai puţin stabilă. Această proprietate a α -keratinei se datorează şi prezenţei vădite a legăturilor transversale disulfidice care stau la baza elasticităţii firelor de păr (fig. 1.5).

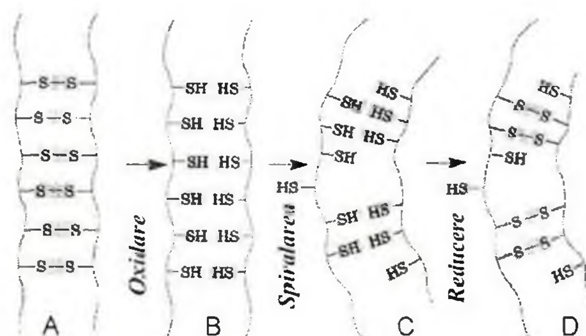


Figura 1.5. *Fazele ondulaţiei permanente a părului:*
A - α-elicea keratinei e stabilizată de legături disulfidice;
B - agentul reducător transformă cistina în cisteină;
C - modificările mecanice schimbă poziţia gr. SH în catene;
D - oxidarea grupa SH formează legături transversale noi.

Unii aminoacizi destabilizează structura plisată, printre ei: Glu, Pro, Lys, Ser, Asp. Alţi aminoacizi favorizează formarea structurii plisate ca: Met, Val, Ile.

Al treilea tip de structură periodică e spirala de colagen. Această structură specifică determină elasticitatea colagenului - componentă de bază a pielii, oaselor. Ca proteină fibrilară el se găseşte, în condiţii diverse, aproape în toate organele, determinînd formarea unor unităţi structurale. Fiind insolubil, s-a studiat dificil şi numai după ce s-a observat că colagenul din ţesuturile animalelor tinere poate fi extras în stare solubilă, deoarece în el lipsesc legăturile transversale, s-a putut stabili unitatea structurală de bază - tropocolagenul. Ultimul e alcătuit din trei catene de aceeaşi lungime şi structură, care pot fi similare la unele tipuri de colagen. 1/3 din aminoacizi îi revine glicinei, cantităţi deosebite constituind prolina, rar întîlnită în alte proteine. Conţine hidroxiprolină şi hidroxilizină. Colagenul are o regularitate mare în succesiunea aminoacizilor - al treilea rest aparţine glicinei. Foarte des se repetă secvenţe ca Gly-Pro-Hidroxipro. Spirala de colagen se caracterizează printr-un grad de stabilitate a lungimii, determinat de interacţiunile cooperative, adică de formarea lanţurilor multiple care se amplifică reciproc (fig. 1.6).

Christian Anfinsen, studiind ribonucleaza, enzimă ce scindează RNA, a stabilit un principiu universal, fudamental în biologia moleculară şi anume: succesiunea aminoacizilor determină şi conformaţia.

STRUCTURA TRIDIMENSIONALĂ

Această structură rezultă din interacțiunea strictă a resturilor de aminoacizi care în succesiunea liniară se localizează departe unul de altul, acesta fiind modul de împachetare a lanțului polipeptidic într-un volum anumit.

Forța motrice la apariția acestei structuri e interacțiunea radicalilor aminoacizilor cu moleculele de apă. Cu alte cuvinte, structura e determinată de mărimea, forma, polaritatea acestor radicali. Anume structura tridimensională conține informația funcțională, ce stabilește proprietățile biologice și informația nativă a proteinelor.

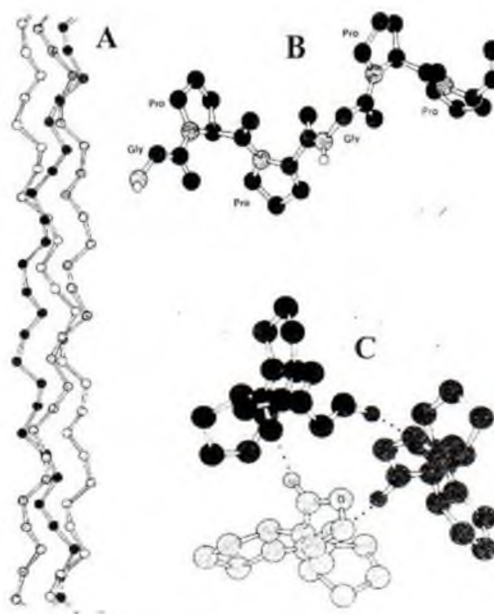


Figura 1.6. *Spirala de colagen*
A - spirala triplă, sunt prezentați atomii Cα;
B - conformația unei catene din triplu, este ilustrată secvența - Gly - Pro - Pro;
C - secțiunea transversală prin modelul de colagen - trei catene unite prin leg. H, unde Cα e al Gly.

Un lanț polipeptidic adoptă, în măsura în care-i permite structura sa primară, configurații de α-elice, de β-structură; împachetarea lanțului caută să satisfacă și afinitățile radicalilor, ceea ce fixează conformația ei. Această conformație e un compromis, deoarece nu se pot realiza toate legăturile posibile, dar acest compromis este cel mai favorabil și cel mai stabil din punct de vedere energetic.

Stabilizarea structurii e determinată de aceleași legături: de hidrogen, electrostatice, hidrofobe, Van der Waals. Prima proteină, a cărei structură a fost stabilită, este *mioglobina* - proteină ce leagă O_2 în mușchi. Ea conține în catena polipeptidică 150 aminoacizi și o grupare neproteică numită ***hem*** (fig.1.7).

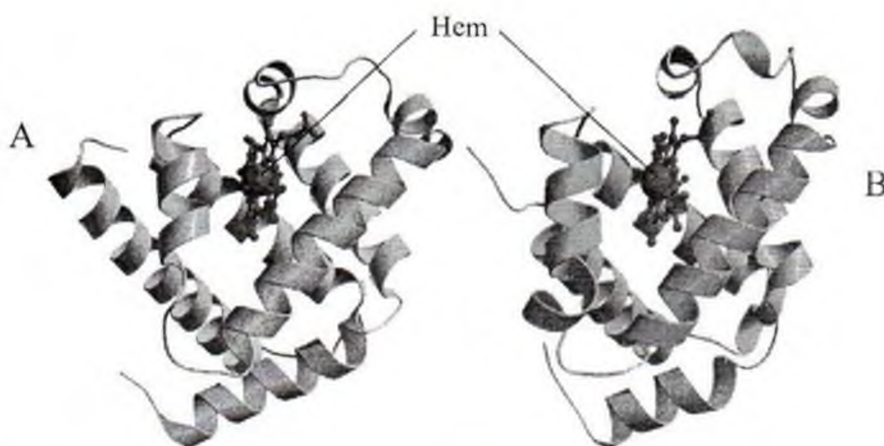


Figura 1.7. *Conformația catenei mioglobinei (A) și a catenei β din hemoglobină (B)*

Scheletul are 8 segmente elicoidale, cel mai lung conține 23 aminoacizi, cel mai scurt -7 aminoacizi, ce includ aproape 80% din resturile de aminoacizi. Radicalii ocupă aproape tot spațiul dintre segmente. Molecula e atît de compactă, încît în interiorul ei pot să se acumuleze numai 4 molecule de apă.

Regiunile elicoidale sunt separate de segmente neelicoidale la nivelul cărora lanțul polipeptidic își schimbă direcția. În aceste puncte finale se postează prolina. Interiorul moleculei e format din aminoacizi cu radicalul nepolar, excepție fiind două resturi de histidină ce leagă hemul.

Grupele polare se află pe exteriorul moleculei, în alte răsuciri - resturi de serină, treonină, asparagină: hemul ce conține Fe leagă o moleculă de O_2.

Cum sunt împachetate alte proteine globulare, la fel constituite dintr-un lanț polipeptidic?

Citocrom C - proteină ce conține hem, dar se deosebește după structura secundară, terțiară, succesiunea de aminoacizi și proprietățile biologice; ***lizozima*** - 40% formează structuri elicoidale; ***ribonucleaza,*** la fel proteină globulară, conține foarte puține α-segmente, majoritatea se găsesc în β-structuri, dar ca și lizozima conține 4 resturi de cisteină ce determină duritatea structurii (fig. 1.8, 1.9).

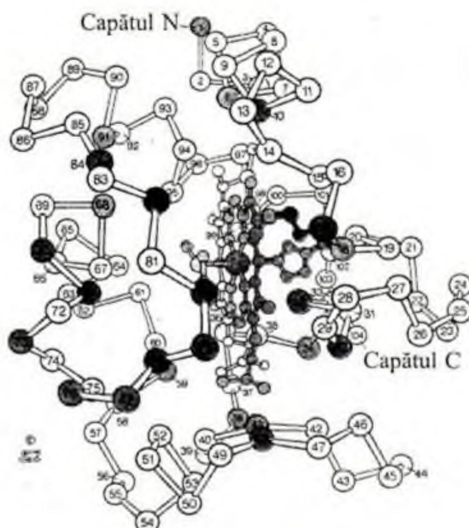


Figura 1.8. ***Scheletul moleculei de citocrom C - în centru hemogrupa fixată covalent , mai intensiv colorat sunt aminoacizii invarianți***

În proteinele ce funcționează în exteriorul celulei astfel de legături intracatenare disulfidice sunt permanente. Fiecare proteină se caracterizează prin structură tridimensională proprie doar ei, special adaptată pentru îndeplinirea anumitei funcții biologice. Proteinele acestei clase sunt mult mai complexe după conformație decît cele fibrilare, îndeplinesc funcții variate și activitatea lor are un caracter dinamic. În majoritatea lor proteinele sunt globulare.

Care sunt datele experimentale ce confirmă că anume conformația moleculei e necesară pentru activitatea biologică a proteinei?

1. S-a constatat că sub acțiunea ureei, la încălzire, structura scheletului covalent rămîne neschimbată, dar lanțul polipeptidic deține o conformație neregulată și își pierde activitatea biologică.

2. La compararea lungimii lanțului și diametrului spiralei cu mărimile reale ale proteinei se constată că un lanț polipeptidic din 584 aminoacizi are în β-structură o lungime de 200 nm și grosime de 0,5 nm, în α-spirală - 90 nm lungime și grosimea de 1,1 nm, globula acestui lanț se cuprinde în lungimea de 13 nm și diametrul de 3 nm. Așadar, lanțul polipeptidic al albuminei este foarte bine împachetat, în caz contrar nu ar îndeplini funcția necesară.

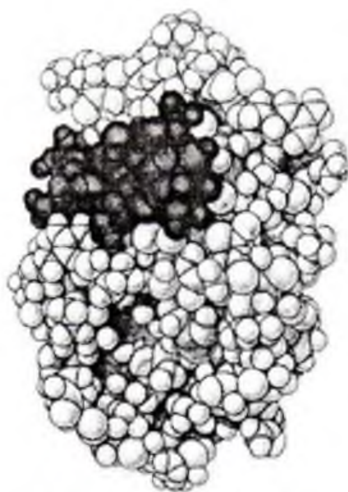


Figura 1.9. ***Modelul spațial al moleculei de lizozimă - mai intens colorat substratul polizaharidic. Lizozima e o moleculă foarte compactă***

Modul de împachetare a catenelor polipeptidice în proteinele globulare într-o globulă sterică e ***structura terțiară.*** La formarea acestei structuri se evidențiază centrele active, locusurile de fixare și identificare a liganzilor ce determină funcția proteinelor.

Concluzie: *Dacă structura secundară e determinată de interacțiunea resturilor de aminoacizi în segmentele apropiate,* ***apoi cea terțiară*** *- de interacțiunea lor din segmentele depărtate. Un rol deosebit îl are și interacțiunea R-grupelor catenelor învecinate.*

O anumită importanță structurală în lanțurile polipeptidice au *aminoacizii invarianți* ce ocupă o poziție standard în lanț, indiferent de specia organismului respectiv (sursa proteinei). Aceștia se grupează la unghi, în locul fixării grupelor prostetice.

La o răcire lentă a soluției proteice sau la evoluarea pH spre normal, proteina își restabilește funcția biologică (*renaturație*), fapt ce confirmă că informația necesară pentru împachetare e determinată de structura primară. Proteina se împachetează nu chiar simplu, de exemplu: ribonucleaza în care se formează 4 punți disulfidice în aceleași poziții ca și în cea nativă, teoretic, din 8 resturi de aminoacizi se pot forma 105 variante, dar se formează numai una. Structura terțiară nu-i rigidă absolut, se caracterizează printr-un grad de fluctuație locală și o anumită elasticitate. De exemplu, moleculele enzimei la legarea substratului își schimbă conformația.

Proteinele se formează din aminoacizi, cu o viteză mare. Proteina compusă din 100 aminoacizi în 5 sec. își capătă conformația finală. Dar dacă s-ar căuta toate variantele, ar fi nevoie de 10^5 ani. Procesul de asamblare are loc momentan, cu un grad mare de cooperativitate. Aceasta înseamnă că dacă s-a împachetat un segment mic, apoi instantaneu crește probabilitatea aranjării celorlalte segmente.

După unele scheme structurale la nivelul organizării terțiare a moleculelor proteice, în planul de asamblare e inclus un concept nou, care facilitează perceperea perfectă a raporturilor dintre structură și funcție, a organizării pe *domenii structurale.* Prin cuvîntul *domeniu* se subînțeleg regiunile compacte cu organizarea terțiară relativ rigidă, separate între ele de către segmentele mai puțin organizate, care permit mișcarea unui domeniu față de altul (fig. 1.10).

Fiecare domeniu structural e responsabil de o anumită funcție a proteinei. Gradul de flexibilitate a domeniilor variază de la mișcări mai ample la altele mai restrînse, în dependență de natura segmentelor interdomeniale. Domeniile se asociază cu funcțiile de legătură. Centrele active ale enzimelor sunt situate între domenii care își schimbă poziția unul față de altul în procesul funcționării biologice a proteinei. O altă proprietate foarte importantă: domeniile cu structuri și proprietăți similare sunt prezente în diferite proteine,

exercitînd roluri asemănătoare.

Multe proteine sunt alcătuite din mai multe lanțuri polipeptidice și se numesc *proteine oligomere* (hemoglobina e constituită din patru lanțuri și patru grupe prostetice cu atomii săi de Fe) (fig. 1.11).

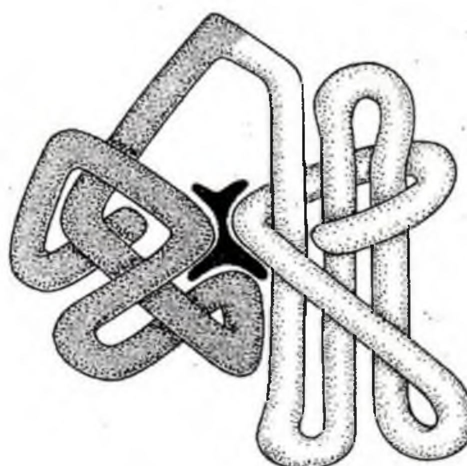


Figura 1.10. ***Imaginea schematică a unei proteine compuse din 2 domenii. Centrul de fixare a ligandului se află între domenii***

Fiecare lanț (2α și 2β) are structura sa terțiară, ocupă poziția de tetraedru unul față de altul, formînd în ansamblu ***structura cuaternară***. Catena α contactează cu β, interacțiunea dintre ele (α-α și β-β) fiind minimă. Hemoglobina animalelor are aproape aceeași structură terțiară și cuaternară, avînd mult în comun cu structura mioglobinei, aceleași funcții. Cu certitudine, în cadrul succesiunii aminoacizilor, proteinele omoloage conțin un rînd de resturi de aminoacizi invarianți, 9 aminoacizi ocupă aceeași poziție; e aceeași histidină distală și proximală, e la fel de reprezentativ și interiorul nepolar al structurii.

Modul de asociere în spațiu a protomerilor - moleculelor oligomere - se atestă ca ***structură cuaternară.*** *La o asemenea proteină funcția specifică se manifestă numai la nivelul structurii cuaternare, protomerii separați sunt neactivi.* Asamblarea subunităților se realizează prin forțe slabe necovalente și asocierea devine stabilă dacă suprafețele de contact (ale domeniilor) sunt complementare, iar un număr cît mai mare de atomi se apropie de nivelul razelor Van der Waals. Complementaritatea asigură un grad înalt de exactitate și de specificitate a structurii cuaternare. Interacțiunea prin suprafețele de contact reprezintă fenomenul de cooperare, adică primele interacțiuni favorizează formarea celorlalte. Structurile cuaternare permit funcționarea unor mecanisme fine de reglare a activității proteinelor (forma T - tensionată și R - relaxată). Perturbația are loc la nivelul unui protomer (Fe iese la 0,6 Å din planul hemului, la oxidare intră un plan - histidina proximală avînd 15 contacte, modifică conformația oligomerului, restructurează spirala și unghiurile ei) (fig. 1.12).

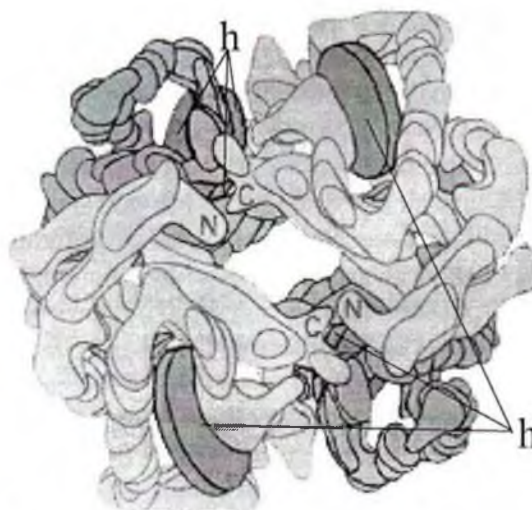


Figura 1.11. *Modelul hemoglobinei β-catene sunt colorate mai intensiv; α-catene sunt celelalte; h - hemul în moleculă (după M. Perutz)*

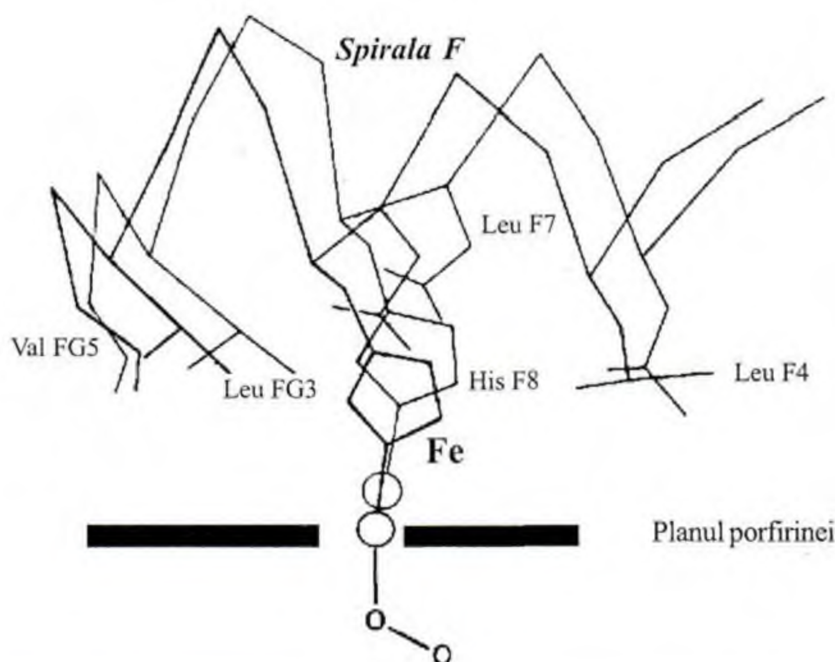


Figura 1.12. ***Modificările conformaționale induse de deplasarea Fe la oxigenare. Structura oxigenată e colorată mai intensiv decît cea dezoxigenată***

Majoritatea proteinelor oligomere studiate, de regulă, au un număr pereche de protomeri, situați bilateral simetric. Moleculele proteice nu sunt rigide, au o anumită flexibilitate şi manifestări diferite: de la mişcări simple în jurul legăturilor ordinare pînă la fluctuații respiratorii. La formarea compuşilor flexibilitatea scade. Vibrațiile moleculare joacă un rol deosebit în procesul de depistare şi stabilizare a stării tranzitorii.

FOLDINGUL. PROBLEMA ÎMPACHETĂRII SPECIFICE A LANȚULUI POLIPEPTIDIC

Au trecut mai mult de 40 de ani de la descoperirea științifică a lui C. Anfinsen, dar şi acum sute de savanți studiază problema împachetării specifice a lanțului polipeptidic.

S-a dovedit că a prezice conformația proteinei în baza succesiunii de aminoacizi (ținînd cont de proprietățile lor, de solubilitatea în apă) nu e atît de simplu. Problema are şi aspect practic: paralel cu dezvoltarea biotehnologiei şi în baza reconstruirii genelor se poate asigura sinteza noilor proteine.

S-a stabilit că la împachetarea unor proteine imense iau parte şi proteinele mult mai mici, numite *ciaperonine,* ce se întîlnesc în bacterii, citoplasma celulelor eucariote, matrixul mitocondrial. Sunt compuse din 2 elemente ce aparțin diferitelor familii proteice - Hsp 60 (Gro EL) şi Hsp 10 (Gro ES), mai substanțial sunt studiate ciaperoninele la E.coli.

Gro EL e constituit din 14 subunități identice, protomeri cu masa moleculară 57 kDa (548 resturi de aminoacizi), fiecare aranjați simetric cîte 7. Analiza roentgenostructurală a descifrat structura spațială a complexului. Fiecare protomer e compus din 3 domenii - eucatorial, apical şi intermediar.

Gro ES (co-ciaperoninele) sunt compuse din 7 protomeri identici aranjați simetric, masa moleculară a protomerului e de 10 kDa și conține 97 resturi aminoacide. Structura spațială a protomerului prezintă un nucleu de β-structură pliantă înconjurată de mici structuri de α-elice (fig.1.13).

Fiecare protomer în ciaperonine poate fixa cîte o moleculă de ATP. Au fost determinate locusurile funcționale, unde are loc fixarea ATP, a polipeptidului substrat și a Gro ES în Gro EL. Sunt constatate particularitățile ciclurilor reactibile în ciaperonine la formarea complexului activ funcțional și fixarea substratului polipeptidic. Sunt propuse diferite modele ale complexului, posibilele mecanisme de funcționare și asamblare a proteinelor prin ciaperonine.

Complexul ciaperoninelor posedă activitatea ATP-azică, se presupune că complexul funcțional activ e obligat să asigure condițiile cinetice primare pentru asamblarea proteinei în afara ribozomului, în porțiuni mai îndepărtate în citozolul celulei. S-a constatat că formarea complexului activ necesită ionii de K^+. Sunt date experimentale ce confirmă că *in vivo* asamblarea lanțului polipeptidic în proteina activă are loc cotranslațional, adică în același timp cu sinteza lanțului în ribozom.

Cum are loc procesul de autoîmpachetare a proteinelor?

Lanțurile polipeptidice desfășurate sau proaspăt sintetizate sunt numite *ghemuri dezordonate.* Studiul asupra proteinei denaturate a stabilit că în interiorul ei apar regiuni răsucite, asociate într-un mod anume și diferite de întreaga moleculă. Aceste substructuri (subdomenii) sau numai unele dintre ele sunt nestabile, fluctuante, servind în calitate de detonant (fitil), în jurul cărora se formează regiuni stabile structurale.

Despre starea denaturată a proteinei se știe mult mai mult decît despre cea desfășurată. Una din primele legități ale împachetării constă în faptul că contactul dintre moleculele de H_2O și aminoacizii hidrofobi trebuie, pe cît e posibil, să fie minim. A doua legitate: globula proteică urmează să fie împachetată compact, însă spațiul ei trebuie să fie umplut astfel încît atomii învecinați să nu se intercaleze.

La momentul actual se disting ***două concepții***:

Prima, mai puțin pronunțată, este cea care presupune că lanțul polipeptidic colapsează rapid pînă la dimensiunile finale ale globulei, cu ieșirea aminoacizilor hidrofobi din contactul cu apa. În starea dată molecula se reorganizează rapid, căpătînd proprietățile ei de structură secundară și terțiară (datele experimentale confirmă această teorie).

A doua concepție, mai reușită, stabilește că lanțul polipeptidic desfășurat foarte rapid formează segmente constante, limitate de structura secundară. Ele interacționează și temporar se realimentează reciproc. Segmentele stabilizate, microdomeniile respective transformă conformația moleculei proteice în direcția organizării supreme prin asociere cu alte segmente, favorizînd contactele dintre segmentele îndepărtate. În stadiile tranzitorii se formează intermediate, structuri ce pot fi determinate foarte greu, dat fiind existența lor de scurtă durată.

Caracteristica structurilor vizate:

a) au dimensiuni mai mari decît molecula nativă și posedă elemente formate de structura secundară;

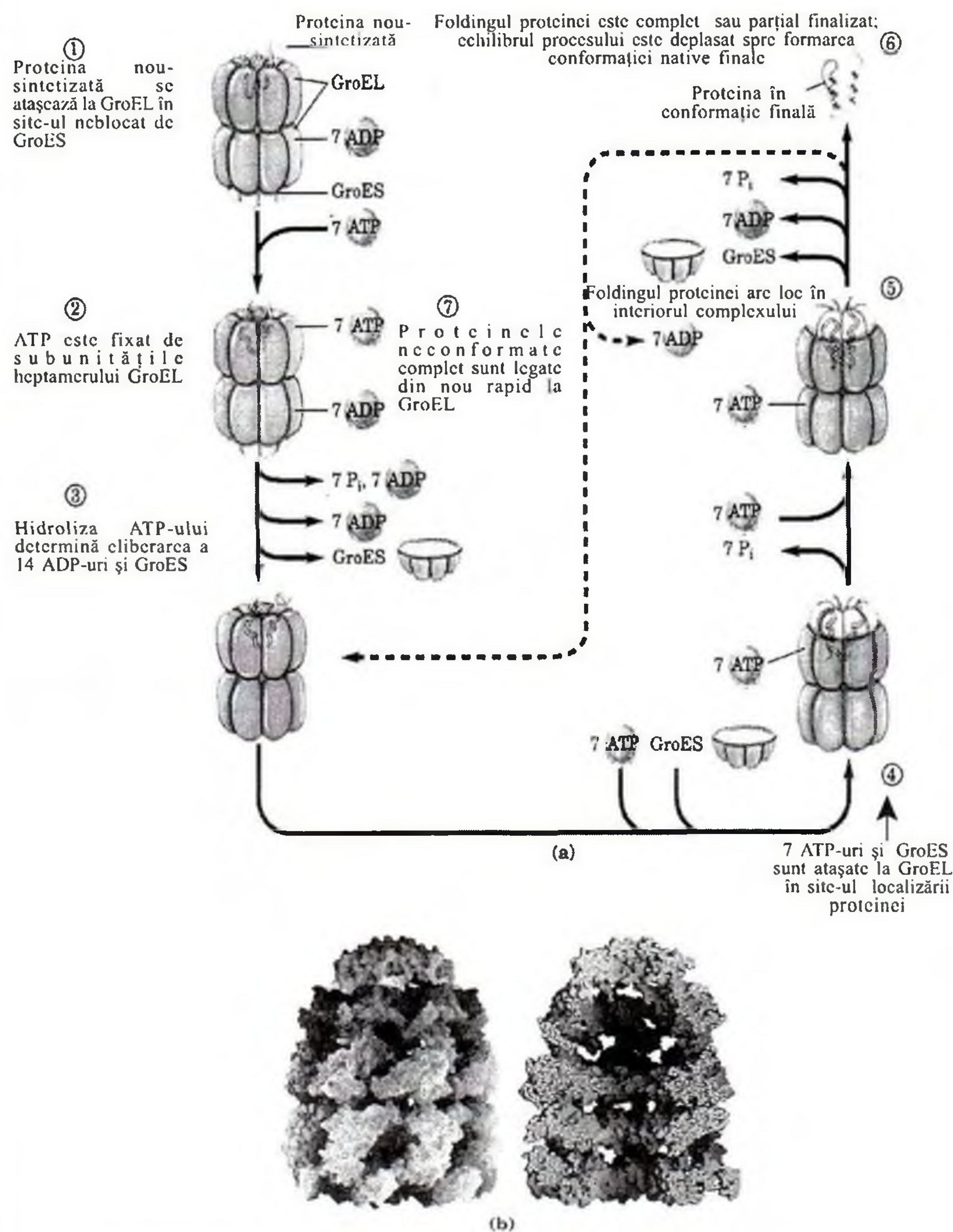


Figura 1.13. Ciaperoninele în foldingul proteinelor:
(a) mecanismul de acțiune a ciaperoninelor *E.coli* GroEl (aparține familiei proteinelor Hsp60) și GroES. Fiecare complex GroEL posedă 2 site-uri formate din 2 inele heptamerice (masa moleculară egală cu 57 000 Da). GroES este, de asemenea, heptamer (masa moleculară egală cu 10 000 Da) și poate bloca unul din site-urile GroEL.
(b) suprafața și secțiunea complexului GroEL/GroES. În imaginea secțiunii se vede spațiul intern al complexului, în interiorul căruia se amplasează alte proteine.

b) savanții au desfășurat proteina nativă și apoi au realizat împachetarea, oprind-o la diferite etape; au identificat intermediatele după formarea legăturii S-S, ce apăreau în procesul de împachetare şi apoi dispăreau pe neobservate în molecula nativă.

S-a demonstrat că unele fragmente formează asociații temporare, altele stabile, şi se păstrează în globula nativă, avînd un rol fundamental la inițierea procesului de împachetare a lanțului. Intermediatele au fost studiate prin metoda izotopilor. Hidrogenul din grupele peptidice a fost înlocuit cu deiteriu prin incubația lanțului polipeptidic în apă grea. Apa grea substituită apoi cu cea obişnuită favoriza includerea hidrogenului în legăturile neformate, şi în continuare, procesul avansa pînă la finisarea deplină. Identificarea regiunilor cu deuteriu a developat fragmentele moleculelor ce se împachetau în primul rînd. Aşa s-a stabilit consecutivitatea formării intermediatelor. S-a confirmat că în citocromul C are loc asocierea primară a două spirale în capetele opuse ale lanțului polipeptidic. În ribonuclează, la început, se formează β-structura situată în centrul moleculei.

Împachetarea poate fi determinată şi prin metode matematice, cu utilizarea funcției energiei potențiale. În computer se introduc valorile în cifre care caracterizează forțele de atracție între perechile de atomi ai moleculei din lanțurile polipeptidice. Apoi se iau coordonatele atomilor la care energia totală a moleculei se micşorează pînă la minim (în eventualitatea că structurile finale au energie minimă). Studiile recente elucidează posibilitatea precizării structurii terțiare după succesiunea aminoacizilor. O serie de investigații confirmă faptul că pentru împachetare sunt necesari factori spațiali şi interacțiune hidrofobă. Rolul diferitelor forțe variază de la o proteină la alta. E posibil că forțele electrostatice joacă un anumit rol la stabilizarea conformației finale, dar nu şi la formarea ei.

Rezultanta finală a foldingului este conformerul nativ ce posedă activitate biologică. Un domeniu cu o structură stabilă secundară care se formează primar, comparativ cu cealaltă parte a moleculei, e numit **foldon.**

Asamblarea proteinelor se consideră un proces fizic de o valoare biologică deosebită. Modelarea computerizată a procesului confirmă că asamblarea demarează de la lanțul desfașurat care fluctuează mult timp fară formarea unor contacte native esențiale. Apoi lanțul atinge întîmplător starea în care persistă un ansamblu de contacte native. După această situație, procesul de asamblare decurge foarte rapid pînă la starea finală - formarea structurii native.

Se consideră că un pas-limită în asamblarea acestor catene este formarea primară a unui complex de contacte native (nivelul asamblării), care, fulgerător, influențează toată molecula. Acest nucleu nu e identic cu stările intermediare. S-a consolidat ideea că:

a) asamblarea începe cu formarea unui complex determinat de contacte native;

b) resturile ce se ihclud în acest nucleu sunt aranjate la diferite distanțe în lanț.

Studiile au stabilit că nucleul asamblării este constituit din resturi nefuncționale mai conservative - proteinele legate evolutiv posedă 2 complexe de resturi conservative: unul pentru centrul funcțional şi altul pentru nucleul de asamblare.

Asamblarea conform conotației «totul sau nimic» corespunde mecanismului nucleației şi creşterii şi e tipică pentru proteinele foarte mici. Asamblarea proteinelor majore trece

prin stări intermediare. Una dintre ele este şi globula în fuziune ce se caracterizează prin stare intermediară compactă cu structură nativă asemănătoare, dar fară structură terţiară rigidă, prin lipsa de cooperativitate la temperatura de topire şi mişcările intramoleculare rapide. O stare asemănătoare e proprie şi intermediatelor.

S-a demonstrat că în globula în fuziune, molecula proteică păstrează unele particularităţi ale topologiei native (aranjarea reciprocă a α şi β structuri), aranjarea rigidă a catenelor proteice. Aceasta clasifică globula ca *intermediat* între catena desfaşurată şi starea nativă, stare termodinamică între cele două. Se presupune că molecula proteică poate exista în trei stări: nativă, globula în fuziune şi cea desfaşurată.

S-a stabilit că globulele în fuziune, genetic, sunt un intermediat universal pentru asamblarea proteinelor.

*Aşadar, prin **folding** se subînţelege aranjarea spaţială corectă de novo a catenei proteice, iar **refoldingul** presupune aranjarea spaţială după denaturare.*

Studiile contemporane confirmă că proteinele auxiliare pot fi împărţite în 2 grupe: ciaperonine moleculare şi enzime. Prima grupă constituie o clasă funcţională de proteine neomogene, care favorizează asamblarea corectă necovalentă a altor structuri polipeptidice *in vivo*, nefiind componente ale acestor structuri organizate, ce îi îndeplinesc funcţiile biologice. Sunt evaluate multe proteine cu funcţii asemănătoare - proteinele şocului termic formează o grupă mare de ciaperonine.

Enzimele denumite *foldaze* catalizează modificările covalente, strict necesare la formarea conformaţiilor native funcţionale ale diferitelor proteine. Deocamdată sunt identificate 2 enzime ca foldaze - *proteindisulfid izomeraza (PDI)* ce catalizează formarea legăturilor native disulfidice şi *peptidil-prolil-cis-trans-izomeraza (PPI)* ce catalizează izomerizarea unor legături stabile trans-peptidil-prolil în cis-conformaţie, necesare pentru asamblarea funcţională a proteinelor. Ambele sunt reacţii covalente, reacţii-limite în etapele foldingului proteinei corespunzătoare. Procesul de Folding şi formarea disulfidelor native sunt procese strîns legate între ele şi decurg simultan.

S-a constatat că PDI prezintă nu numai o izomerază ce catalizează formarea legăturii disulfidice în peptidele sintetizate, dar şi o ciaperonină moleculară, ce participă la procesul foldingului catenelor. Activitatea ciaperoninică nu e dependentă de cea izomerazică. Funcţionînd ca foldază în procesul de folding, este necesară atît activitatea izomerazică, cît şi cea ciaperoninică.

PEPTIDELE ACTIVE

Endotelinele reprezintă o familie de peptide noi cu o activitate biologică deosebită. În 1988, M. Yanagisawa şi alti savanţi au căpătat din cultura endoteliului vascular un peptid cu un efect biologic foarte pronunţat, numit *endotelină*. Timp de zece ani s-a efectuat un studiu amplu referitor la peptida respectivă, receptorii ei, enzima - endotelin convertaza şi inhibitorii ei.

Endotelinele sunt cei mai efectivi factori vasoactivi. Sunt implicate în patogenia unor forme de maladii hipertonice, ischemii renale, hemoragii subarahnoidale. Este determinat rolul lor în infarctul miocardic, aritmiile cardiace.

De rînd cu endotelina-1 (ET-1), un peptid biciclic din 21 aminoacizi, s-au depistat şi alte 2 izoforme - ET-2 şi ET-3, codificate probabil de gene diferite. Aceste peptide sunt marea speranţă a savanţilor pe viitor! Toate trei endoteline în mod diferit sunt expresate în ţesuturile vasculare. Primele două au o activitate majoră de vasoconstrictori.

Sunt clonate şi secvenate 2 tipuri de receptori (ET-A şi ET-B), care s-au depistat atît în endoteliul vaselor, cît şi în rinichi, plămîni, suprarenale, ţesutul nervos. Constricţia vaselor e mediată de ET-A receptori, structuri fixatoare de G-proteină; pe cînd inducţia receptorilor ET-B conduce atît la constricţia, cît şi la dilatarea vaselor. Funcţia acestor receptori e cuplată cu activarea fosfolipazei C şi A_2, cu majorarea nivelului de Ca^{2+} intracelular, formarea intensivă a prostaciclinei şi/sau tromboxanului A_2. ET-1 şi ET-3 în ţesutul nervos intensifică sinteza fosfoinozitfosfatului.

ET-1 apare ca rezultat al proteolizei limitate a endotelinei majore - (B = ET) în trei etape:

a) hidroliza proteolitică a preproendotelinei-1 la Arg(92) în endotelina-l-Lys-Arg (40) sub acţiunea convertazei (E_1);

b) hidroliza capătului C-terminal B = ET-l-Lys-Arg(40) la B = ET-l-(38) de o carboxipeptidază (E_2);

c) scindarea premergătorului B-ET-1 la legătura Trp(21) = Val (22) cu formarea endotelinei ET-1, etapă determinată de convertaza respectivă (E_3).

Schematic:



E_3 (enzima endotelin convertaza - ECE-1) este o metalproteinază din grupa celor fixate în membrană, care participă în procesingul postsecretorial al hormonilor peptidici şi neuropeptidelor. Are unele proprietăţi asemănătoare cu familia Zn^{2+} - metaloproteazelor. În centrul activ este restul Tyr şi regiunea fixatoare de Zn^{2+}.

E depistată enzima ECE (endothelin-converting enzyme) în majoritatea ţesuturilor. Activitatea ei e determinată atît prin metode imunochimice, cît şi prin testare biologică. Ea prezintă un dimer cu subunităţile de 120-130 kDa fixate prin punţi disulfidice. Splaisingul alternativ a demonstrat variante ale ECE că grupa N terminală e diferită, cu o specificitate selectivă la substraturi. ECE-1 are o specificitate mare la B-ET-1 şi mult mai puţin efectivă la ET-2 şi ET-3. Aceste date presupun prezenţa enzimei în mai multe izoforme ale ECE-1 (1 α şi 1β).

ECE-2, o altă endotelin convertază, în 59% e omoloagă cu ECE-1 - o expresie majoră e depistată în țesuturile creierului. Ambele enzime au structuri de bază comune: sunt proteine integrale membranare de tip II, ce conțin o secvență cu Zn^{2+} caracteristică; au 10 site-uri glicozil, cu o localizare nu chiar identică, sunt inhibate de aceiași inhibitori cu diferită sensibilitate.

ECE-2 hidrolizează B-ET-1 mai efectiv decît B-ET-2 și B-ET-3. Dar cea mai esențială deosebire e pH optim pentru forma 2, care este egal cu 5,5, și enzima e neactivă la valori neutre, optime pentru ECE-1. Prezența, de asemenea, a ECE-2 în țesuturile neendoteliale demonstrează că acest ferment funcționează ca enzimă extra- și intracelulară, responsabilă de hidroliza intraveziculară a precursorului ET-1, sintetizat în aparatul Golgi. Cele prezentate presupun 2 tipuri de sinteză a endotelinelor: *extra și intracelulară.*

Sunt depistate și enzime ce degradează fiziologic endotelinele «mature»- metaloendopeptidaza cu pH optim de 5,5; «endotelinaza» (serin proteinaza).

Endotelina și, corespunzător, ECE reglează tonusul vaselor și, în general, cardiohemodinamica. Peptidul participă la patogenia hipertensiei esențiale - inhibitorii ECE previn dezvoltarea hipertensiei pulmonare în experiment. Efectele sunt dependente de funcționarea sistemului renină-angiotenzină.

S-au depistat unele efecte neurologice ale ET-1 și ET-3, modificări în reacțiile de comportare, efect central cardiorespirator.

În prezent se presupune că endotelinele, de rînd cu alți reglatori ca histamina, bradikinina, angiotensina II, participă la relisingul diferențiat al adrenalinei și/sau noradrenalinei din suprarenale în stres (situații extremale). Esențial e rolul lor în reglarea stării funcționale a endoteliului - stratului intim arterial și venos din diferitele vase ale organismului. Dereglările metabolismului normal al endotelinelor, expresia intensivă a precursorilor și receptorilor respectivi, activitatea majoră a ECE devin factori de dezvoltare a proceselor patologice din organism, motiv care impune investigarea unor metode de control și de reglare a activității lor în organism - inhibitorii metaloproteazelor. Inhibitor clasic se consideră fosfoamidonul. Mult mai activ este analogul *tiorfanului*. În baza compușilor acidului fosfonic s-au sintetizat inhibitori ai ECE, foarte puternici și selectivi. Sunt utilizați și analogi ai ET-1, care blochează activitatea ECE atît *in vitro*, cît și *in vivo*.

În ultimii ani se confirmă că *unele peptide cu o structură foarte simplă, predominant din glicină și prolină (PG, GP, PGP, GPGG), posedă o activitate biologică deosebită referitor la coagularea sîngelui*, acțiunea protectoare a mucoasei, nocicepție. La aceste peptide se alătură și PGc (ciclic) depistat în creier. O particularitate deosebită a acestor fragmente, ce conțin prolina terminală, este stabilitatea majoră în fluidele organismului față de altele (de mii de ori).

Aceste peptide au ca sursă și alimentele, căci e stabilit că tripeptidele ce conțin prolină sunt absorbite de celulele endoteliale intestinale nescindate. Un precursor al lor poate fi și *enterostatina* (APGPR), precum și colagenul și elastina.

Compartimentalizarea strictă a proceselor permite realizarea unor funcții diametral opuse, de exemplu, acidul glutamic, glicina, care îndeplinesc atît rol plastic, cît și energetic și servesc drept neurotransmițători. Asemenea compartimentalizare e reală și pentru

precursorii peptidelor reglatoare (PR). Determinant poate fi țesutul, organul, precum și repartiția locală a proteazelor.

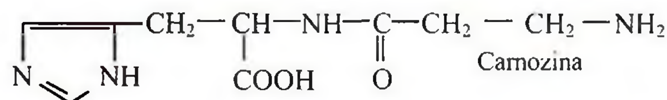
S-a stabilit că aceste peptide blochează agregația trombocitelor, formarea trombinei și a fibrinei; sunt inhibitori ai fibrinazei ($XIII_a$). Posibil că aceste peptide simple ce conțin prolină (fragmente ale colagenului și elastinei) sunt factori endogeni cu acțiune de antitromboză și trombolitică.

Prolincomponentele peptidice, PGP și GPGG, amplifică rezistența mucoasei gastrice la acțiunea factorilor nocivi, devenind *protectori antiulceroși.* Este inhibată endo- și exosecreția pancreasului, motorica stomacului, utilizarea alimentelor (anorexia) de enterostatină (pentapeptida APGPR).

Peptida GP_c are efect stimulator în consolidarea memoriei, posibil se formează din colagen sau elastină.

Peptidele scurte, ce conțin prolină, sunt activatori ai hemotaxisei, favorizează formarea superoxidului, neutralizează analgezia provocată de morfină. Comparînd structura peptidelor respective, se presupune dependența efectului de prezența prolinei la capătul N-sau C-terminal al peptidei.

Carnozina – dipeptida β-alanil-L-histidina, extrasă în anul 1900 din mușchiul scheletal. În prezența acestei dipeptide, mușchiul izolat de broască se contractă ca și la acumularea cantităților mari de lactat; pI a carnozinei este de 6,9, iar a anserinei - 7,1 – ultima este derivatul ei metilat. Acești compuși sunt ideal adaptați pentru rolul de tampon în regiunea fiziologică a pH – au o cotă pînă la 40%.



Capacitatea tampon protonică mărimea β- se măsoară în "slake" și se determină după numărul de mkmol NaOH sau HCl, necesari pentru a modifica pH a 1 g țesut cu o unitate – de la 6 la 7 sau 6,5 - 7,5. Se consideră că și peptidele înrudite iau parte la reglarea activității enzimatice, la diminuarea reacțiilor oxidante.

Datele experimentale confirmă că carnozina prezintă un antioxidant multifuncțional, capabil să inactiveze radicalii liberi, să formeze compuși chelați cu metalele prooxidante (Cu) și posedă capacitatea de a forma conjugate cu produse aldehidice toxice de oxidare a lipidelor. În prezența carnozinei, *limita Heiflik* se extinde – celula din cultură îmbătrînește mult mai lent. Posibil, e și rezultatul unic al efectului diferit al carnozinei ca: izvor al histidinei, imunostimulator și neurotransmiter etc.

Glicozilarea nefermentativă a proteinelor este un proces dependent de vîrstă, activ în diabet. Formarea legăturilor transversale între polipeptidele modificate și proteinele normale este cauza complicațiilor în diabet. S-a confirmat că carnozina este un agent antiglical natural, ce se conține preponderent în mușchii albi cu o glicoliză intensivă. Carnozina indusă de aldehida malonică inhibă formarea în proteine a legăturilor transversale, precum și formarea grupărilor carbonilice în proteine, specifice la îmbătrînirea proteinelor și celulelor. Carnozina e capabilă să reacționeze cu metil-glioxalul și, indusă

de el, preîntîmpină modificările proteice. Carnozina protejează celulele de acțiunea toxică a aldehidelor și cetonelor.

Proteinele glicate sunt imunogene, iau parte la generare în procesul de îmbătrînire a autoantigenelor. E stabilit că carnozina glicată nu e mutagenă, spre deosebire de aminoacizi. Ea inhibă reacția de glicare a lizinei, modulează toxicitatea produsului pentru cultura celulelor.

Îmbătrînirea proteinelor este însoțită de acumularea polipeptidelor aderante, îndeosebi ale celor ce conțin grupa carbonil. Ultimele apar ca rezultat al oxidării radicalilor aminoacidici de FAO, precum și la interacțiunea produselor oxidării lipidelor – aldehida malonică și hidroxinonenalii – cu lizina și în al treilea rînd, în procesul de glicare în care aldehidele toxice induc formarea grupărilor carbonil în proteine.

S-a constatat că carnozina nu doar se fixează de gruparea carbonil din proteine, dar și modulează activitatea lor, inhibînd formarea legăturilor transversale în proteine, ca rezultat al generării complexului proteină-carbonil-carnozin aduct.

Deocamdată nu e clar unde anume are loc formarea acestui complex: în interiorul celulei sau în afara ei?

Care este soarta proteinelor carnozilate?

Posibil că reprezintă o formă a lipofuscinei – pigmentul îmbătrînirii. Lipofuscina are o natură foarte heterogenă și efectele ei sunt controversate. E enorm de multă în țesuturile bogate în carnozină – nervos și mușchi, creier. Posibil că forma lipofuscinei fără carnozină e capabilă să reacționeze cu alte macromolecule celulare.

O altă variantă ar fi proteoliza - scindarea de un sistem de *proteozome*. Carnozina maschează grupările carbonil, care sunt rezistente și chiar pot inhiba funcția proteozomelor. S-a constatat că în prezența carnozinei se activează metabolizarea unor proteine greu metabolizante.

Grupele carbonil se formează și la oxidarea fosfolipidelor (etanolamina) membranare. La depurinizare și depirimidinizare a DNA, cu scindarea legăturilor glicozidice, se formează o moleculă de D-oxiriboză cu proprietăți toxice aldehidice. Carnozina fixează, posibil, și aceste forme toxice, inhibînd formarea legăturilor transversale proteină - DNA, cu participarea aldehidelor, și micșorează numărul de aderații cromozomiale în cultura celulară. Carnozina favorizează procesele de detoxifiere. O dată cu îmbătrînirea, concentrația carnozinei se micșorează: nivelul corelează cu durata vieții. Indivizii care au o statură înaltă sunt asigurați cu longevitate mai mare.

Biosinteza carnozinei: se sintetizează din *β-alanină* și *histidină*, reacție catalizată de *carnozin sintaza*. β-alanină — aminoacid neproteinogen se produce în ficat ca metabolit final în degradarea uracilului și a timinei. Celulele capabile de sinteză posedă și un sistem benefic de transport al acestui aminoacid. Cu cît celulele sunt mai diferențiate, absorbția β-ala este mai efectivă. În oligodendrocite viteza maximă de sinteză corespunde capacității majore de expresie a proteinei – *mielina* – marker al diferențierii oligodendrocitelor în creier.

Carnozina e legată de celulele neurogliei, care pot absorbi rapid carnozina marcată print-un mecanism activ de transport al dipeptizilor. E prezentă carnozina în neuronii senzitivi, împreună cu acidul glutamic, ce marchează rolul de neuromediator în acest

proces. În secreție se consideră că sunt prezente mai multe mecanisme (depolarizare membranară, tumefierea astrocitelor cauzate de ionii K^+, inversarea mecanismelor de transport). Se confirmă mecanismul vezicular, exocitoza determinată de Ca^{2+}.

Carnozina este un inhibitor selectiv al NO-dependent-activare a guanilatciclazei, ce o poate utiliza ca remediu efectiv la tratarea sepsisului, cancerului, astmului, migrenei, toate fiind legate de activarea sistemului de semnalizare intracelular: NO-Gc solubilă – GMPc.

Hidroliza carnozinei e cauzată de 2 izoenzime: 1) carnozinaza tisulară (citozolică) și 2) cea serică (KF.3.4.13.3 și KF3.4.13.20). Forma tisulară e zincodependentă și poate fi stabilizată de alte metale bivalente (Cd >Mn >>Zn >>Co).

Carnozina mărește de 2-3 ori longevitatea celulelor cultivate *in vitro*. E stabilit efectul de întinerire a celulelor senile. Carnozina distruge celulele transformate sau cancerigene. În amestec cu piruvatul (acidul oxaloacetatul și α-cetoglutaratul), efectul se micșorează. Citratul, izocitratul, fumaratul, succinatul și malatul nu influențează asupra efectului citotoxic al carnozinei.

Efectul carnozinei poate consta în:

a) diminuarea gradului sau exprimarea efectelor care conduc la includerea mecanismelor ce blochează ciclul celular. De exemplu: poate favoriza micșorarea lungimii fragmentelor pierdute în DNA-telomerică sau diminuează metilarea DNA;

b) micșorarea efectelor fiziologice determinate de modificările în RNA, ce ar favoriza îndepărtarea momentului de oprire terminală a diviziunii celulelor. Un astfel de efect s-ar manifesta în întinerirea fenotipului celular, care se observă la cultivarea celulelor in vitro cu carnozină. Carnozina, posibil, inhibă glicoliza, de altfel și formarea de ATP în celulele cancerigene. Acest efect e reversibil la adaosul piruvatului.

CLASIFICAREA PROTEINELOR

Savanții M. Levitt și C. Chothia (1970), examinînd structura proteinelor, le-au divizat în ***5 clase*** (fiecare clasă diferă ***după prezența și poziția α-spiralei și β-structurii*** (fig. 1.14, a-h)):

I. Proteine ce conțin 100% α-elice, formînd o structură globulară.

II. Proteine ce conțin β-structură și, de regulă, sunt alcătuite din două straturi antiparalele sau situate în formă de "butoiașe".

III. Proteine ce includ atît α, cît și β componente segregate în structura terțiară.

IV. Proteine ce înglobează α/β segmente alternate în structura secundară, formînd structura terțiară cu centrul β și încercuite de α-spirală.

V. Proteine neorganizate cu structură secundară evidențiată nesemnificativ. Plierea lanțului este determinată în exclusivitate de interacțiunea radicalilor (coit proteic) - punților disulfidice. Acestea sunt proteinele mici.

Clasificarea sus-numită a fost desăvîrșită de J.S. Richardson (1981).

Așadar, organizarea structurală este determinată de modul aranjării reciproce a structurilor secundare. De aceea, un imperativ primordial pentru prognosticarea structurii proteinelor o au principiile de împachetare a elementelor constituente. Se știe că un rol deosebit în acest context îl joacă repartiția resturilor hidrofobe în α-elice și β-structură.

Proteinele se mai clasifică (W. Bennet şi R. Huber, 1984) şi ***după dinamica domeniilor structurale:***

I. Proteine cu domenii rigide, imobile, dure, unite prin segmente mari, flexibile, ce le permit acestora fluctuaţii în diapazon larg reciproc.

II. Proteine cu domenii rigide, dure, unite prin porţiuni mici, denumite “Balama”, cu o circulaţie mai redusă.

III. Proteine în care domeniile au roluri diverse - folosesc flexibilitatea pentru asigurarea unor funcţii (de legare); interacţionează cu grupări determinate de antigen.

Clasificarea proteinelor e o problemă dificilă, deoarece structura multor proteine nu este studiată complet. O clasificare a proteinelor după funcţie e practic imposibilă. Există proteine cu structuri apropiate, dar care îndeplinesc funcţii diferite. Posibilităţi limitate de clasificare prezintă şi proprietăţile fizico-chimice.

După atitudinea faţă de hidroliză se disting proteine *simple* şi proteine *conjugate* (proteide). Proteinele simple la hidroliză elimină numai aminoacizi, iar cele conjugate mai conţin şi un component neproteic şi, deci, deosebim: fosfoproteide, cromoproteide, nucleoproteide, glico-, lipo-, metaloproteide.

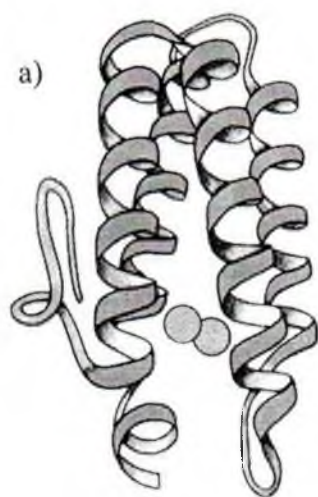
Holoproteinele (proteine simple). Protaminele au o masă moleculară mică şi un caracter alcalin, determinat de prezenţa argininei şi lizinei - 60-80%, fiindu-le caracteristic punctul izoelectric ce se află în mediul alcalin şi la fierbere se coagulează la adaosul bazei în soluţie. Proteinele sunt solubile în apă, se dizolvă şi în soluţie de NH_4, soluţii diluate de acizi şi baze. Aceste proteine se găsesc în cantităţi mari în celulele germinale naturale ale peştilor: *salmina* (lapţii somnului), *scumbrina* (scrumbia), *clupeina* (heringul), în componenţa lor triptofanul lipseşte. Aminoacizii ce conţin sulf în majoritatea lor nu includ, de altfel ca şi tirozina, şi fenilalanina.

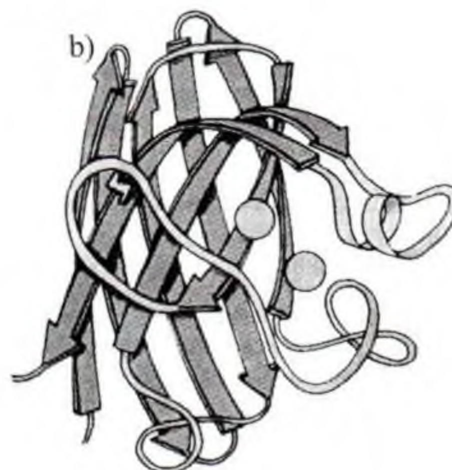
Histonele din componenţa nucleului celular iau parte la reglarea metabolică a activităţii genomului. Aminoacizi bazici se conţin pînă la 30%. Masa lor moleculară e mai mare decît la protamine, conţin puţin sau deloc triptofan. Sunt solubile în aceiaşi solvenţi şi precipitate de soluţia NH_4, se coagulează la încălzire.

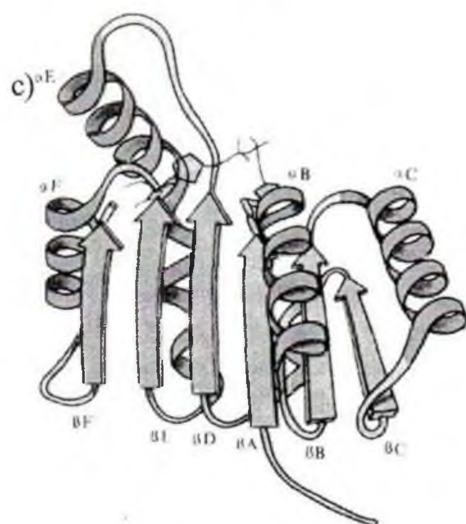
Albuminele şi globulinele prezintă masa principală a proteinelor sanguine, a lactatelor, masei musculare, a proteinelor oului. Raportul albumine-globuline în diferite ţesuturi rămîne constant şi este egal cu 1,5-2,3. În patologie acest coeficient se schimbă. Albuminele sunt mai solubile în apă, pe cînd globulinele sunt solubile numai în soluţii diluate de săruri, iar în celelalte cazuri — insolubile. Solubilitatea diferită e folosită pentru fracţionarea şi determinarea lor în practica clinică. Pentru ultimele scopuri azi se foloseşte electroforeza pe hîrtie sau în gel, la cantităţi neînsemnate de sînge. Albuminele conţin 575 aminoacizi, formînd un lanţ polipeptidic, au un punct izoelectric mic. Ele determină presiunea oncotică a sîngelui, iau parte la transportul substanţelor, prezintă o fracţie omogenă. Globulinele formează o fracţie heterogenă, fiecare comportînd diferite funcţii.

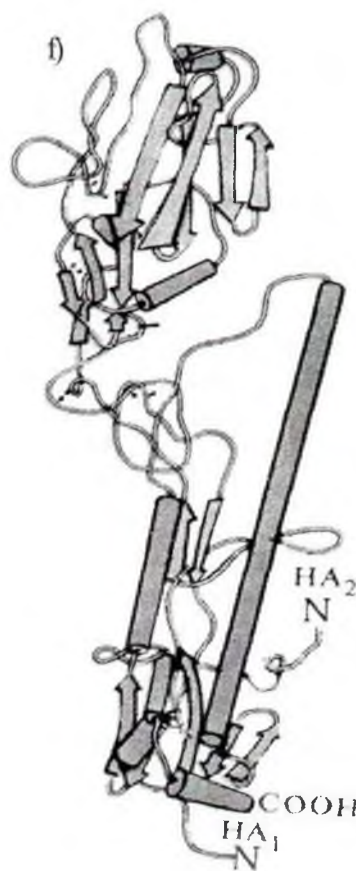
Glutelinele şi prolaminele sunt proteine de natură vegetală, se depozitează în seminţele cerealelor, masa principală a glutenului.

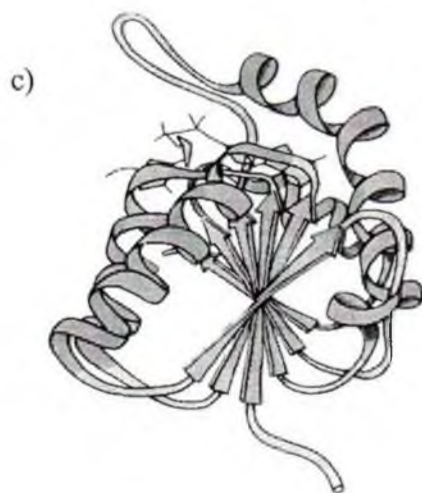
Prolaminele sunt solubile în soluţie apoasă de alcool etilic (60-80%). Conţin 20-25% acid glutamic şi 10-15% prolină. Reprezentanţii prolaminelor sunt: gliadina (grîu), zeina (porumb), orzeina (orez), hordeina (orz).


a)


b)


c)


f)
HA$_2$
N
COOH
HA$_1$
N


c)

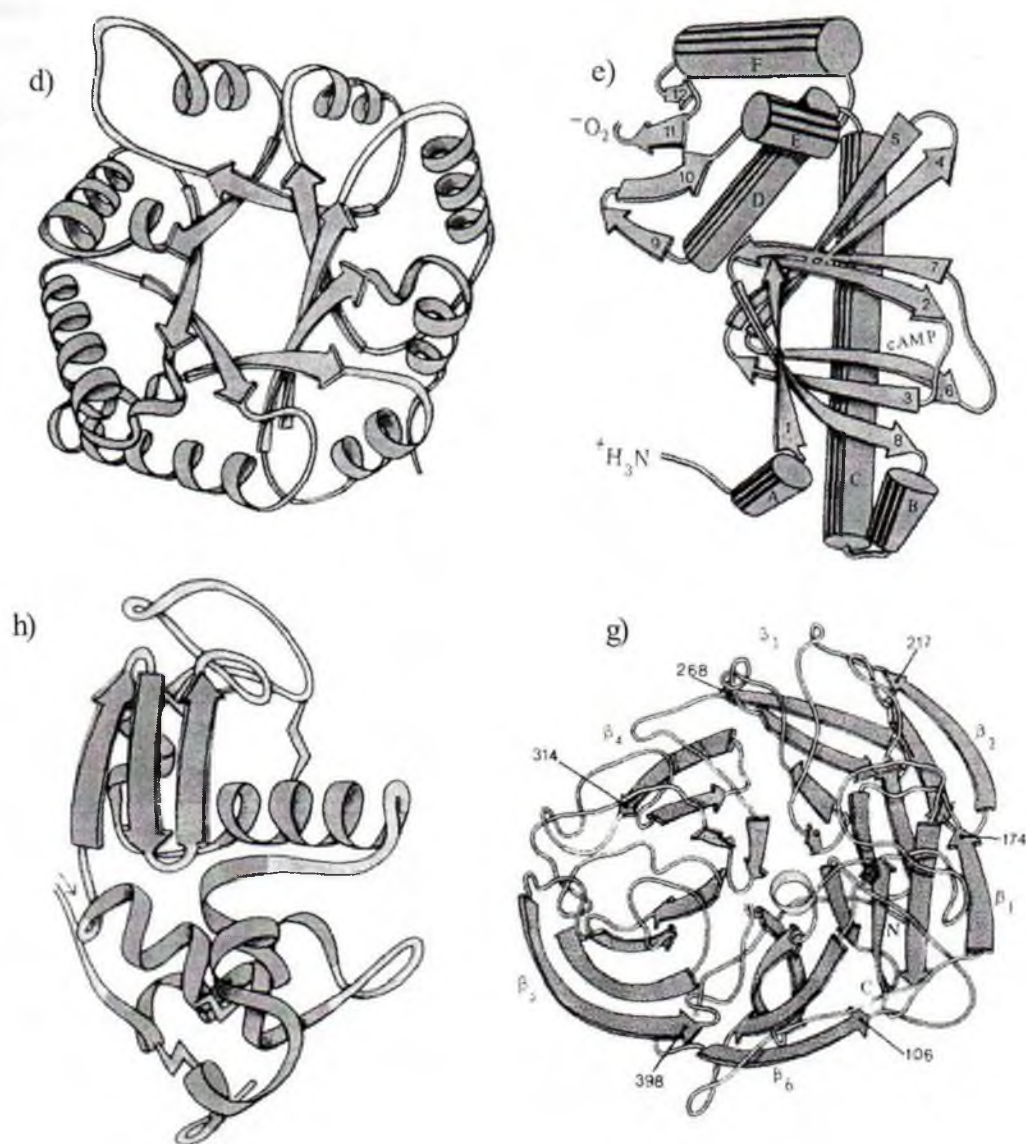


Figura 1.14. *Tipologia unor structuri proteice:*
α - spiralele sunt în formă de cilindre și spirale;
β - structura e reprezentată prin săgeți;
a) proteină în α - structură (miohemeritina);
b) proteină în β - structură (Cu, Zn-superoxiddismutaza);
c) α/β structură (2 proiecții ale domeniului NAD din LDH);
d) hemaglutenina virusului gripei;
e) α/β structură (triozofosfatizomeraza);
f) CAP din E. coli;
g) α+β structură (lizozim);
h) neuroaminidaza virusului gripei.

Heteroproteidele (proteine conjugate) conțin, pe lîngă compuși proteici, diverse grupe neproteice numite grupe prostetice. Acestea sunt mai profund studiate. Ele sunt indispensabil legate de proteină și prezintă un anumit interes biologic.

Nucleoproteidele sunt compuse din proteine și acizi nucleici. Denumirea lor e derivată de la numirea nucleului celular, dar se află și în alte compartimente ale celulei. De aceea nucleoproteidele constituie o clasă individuală de substanțe organice, cu o componență, structură și funcție independentă de localizarea lor în celulă. Astăzi putem afirma că natura proteinelor studiate în celulă e determinată de un reprezentant al nucleoproteinelor - DNA.

Proprietățile organismelor vii, ale celulelor și întregului organism sunt determinate însă de proprietățile proteinelor sintetizate. La hidroliza perfectă se observă descompunerea nucleoproteidelor în proteine și acizi nucleici. Componența proteică o alcătuiesc histonele bogate în arginină și lizină. Natura proteinelor nu este suficient studiată.

Cromoproteidele sunt compuse din compartimentul proteic și cel neproteic colorat, de unde provine și denumirea lor; iau parte activă și obligatorie la procesele de acumulare a energiei, începînd cu fixarea energiei solare în plantele verzi, utilizarea ei judicioasă de către organismul animalelor și al omului: fotosinteză, respirația celulară, transportul O_2 și CO_2, reacțiile de oxido-reducere, senzațiile de lumină și culoare etc.

Reprezentanți: clorofila, hemoproteidele, sistemul de citocromi, catalaza, peroxidaza. La baza structurii grupei prostetice se află inelul porfirinic, care adiționează elemente chimice diferite (Fe, Mg).

Fosfoproteidele sunt proteine compuse dintr-o parte proteică și acid fosforic. Acestor molecule le sunt proprii legături esterice ale acidului fosforic cu proteina ce se adiționează prin OH al aminoacizilor — serina, treonina.

Reprezentanții proteidelor — cazeinogenul (proteina laptelui), fosfovitina, vitelina, vitelinina (din gălbenușul oului), ihtulina (icre de pește) — ocupă un loc deosebit în compușii ce conțin fosfor, mulți dintre aceștia se găsesc în sistemul nervos central. Fosfatul labil e absolut necesar pentru funcționarea celulei și exercitarea menirii sale biologice. În procesul de embriogeneză, de creștere postnatală și dezvoltare servesc drept material prețios energetic și plastic. Un șir întreg de enzime, ce reglează procesele de metabolism celular, se caracterizează prin legătura strînsă cu fosforul.

Glicoproteidele, ca exponenți ai grupei prostetice servind glicoaminglicanii, se includ în țesuturi și în formă liberă. Legătura cu glucozamina, galactozamina compușilor proteici se realizează prin asparagină, serină, treonină. Componența glucidică determină rolul biologic al glicoproteidelor indispensabili de existența membranelor celulare, participînd la reacțiile imunologice, schimbul de ioni, adeziunea intercelulară.

Lipoproteidele, ca grupă prosteică, sunt reprezentate de lipide neutre, acizi grași liberi, fosfolipide, colesterol, cu funcții variate. Fiind compuși ai membranelor celulare și organitelor, pot exista și în formă liberă în plasma sîngelui.

Metaloproteidele — metalul este legat complex de resturile de aminoacizi (transferină, ceruloplasmină, feritină). Aici se includ și unele proteine enzimatice ca anhidraza carbonică (Zn), ascorbatoxidaza (Cu) etc.

PROPRIETĂȚILE GENERALE ALE PROTEINELOR

Proteinele sunt compuşi macromoleculari cu proprietăți hidrofile, adică sunt solubile. Această însuşire se datorează repartizării pe suprafața moleculelor a resturilor de aminoacizi cu sarcini electrice sau a grupelor polare. Proteinele fibrilare sunt insolubile în apă, pe cînd cele globulare atestă grade diferite de solubilitate.

Solubilitatea proteinelor

Solubilitatea în apă este puternic influențată de diverse săruri ale metalelor uşoare: NaCl, $MgCl_2$, Na_2SO_4, $(NH_4)_2SO_4$. În concentrații mici ele au un efect favorabil. De exemplu, globulinele sunt greu solubile în apa pură şi se dizolvă uşor numai în soluții saline diluate. Efectul nu depinde de natura sării, dar de concentrația ei şi de numărul de sarcini ale fiecărui ion din soluție. Mai eficace sunt sărurile ce conțin ioni bivalenți (Mg), față de cele ce au ioni monovalenți. Solubilitatea mărită e determinată de creşterea gradului de disociere a grupelor ionizate în proteine.

În concentrații foarte mari sărurile amintite reduc solubilitatea proteinelor pînă la precipitarea lor din soluție - *salifiere*. Procesul e mai efectiv în punctul izoelectric al proteinelor. Mecanismul e complicat: ionii de sare atrag moleculele de apă polarizată, micşorînd cantitatea de apă ce interacționează cu proteina, cauza fiind concentrațiile mari de sare în care numărul ionilor este imens față de numărul grupelor cu sarcină a proteinei. Dar avînd în vedere că solubilitatea proteinelor în apă este dependentă de formarea membranei apoase în jurul grupelor ionice hidrofile, transferul molecular de apă la alți ioni micşorează solubilitatea proteinei. Procesul decurge mai rezultativ atunci cînd toate operațiile se efectuează la temperaturi joase, în condițiile în care proteinele sunt mai stabile.

Diferite proteine se salifiează la diferite concentrații de săruri — fenomen ce este utilizat pentru fracționarea lor. Globulinele precipită cînd soluțiile care le cuprind sunt aproximativ semisaturate în $(NH_4)_2SO_4$, pe cînd albuminele precipită la concentrații mai mari — de 75% saturație.

Procesul de salifiere a proteinelor în multe cazuri nu e legat de pierderea capacității proteinei de a se resolubiliza după înlăturarea agentului. Eliminarea prin dializă a $(NH_4)_2SO_4$ sau Na - sulfat complet conduce la resolubilizarea în apă a proteinei salifiate cu formarea soluțiilor adecvate. Capacitatea de resolubilizare rapidă se menține şi în cazul înlăturării imediate a proteinei de la salifiat (alcool): proteina îşi păstrează proprietățile native.

Soluțiile în apă a proteinelor au un caracter *coloidal*. Diametrul unor astfel de particule e de la 1 la 100 mmc. Remarcăm soluții reale:

a) ionice — particulele sunt mai mici decît 1 mmc, disociază în ioni, conduc curentul electric;

b) moleculare — se descompun pînă la molecule, nu disociază şi nu conduc electricitatea (glucoza, alcoolul) — dau spațiu optic nul.

Dacă particulele sunt mai mari de 100 mmc şi substanța rămîne solidă în faza lichidă, rezultă suspensia, iar cea lichidă în lichid - emulsie.

Pentru soluțiile coloidale (dar proteinele formează soluții coloidale) e caracteristic:

a) fenomenul lui Tindal pozitiv;

b) nu difundează prin membrane semipermeabile, care uşor transferă apa sau substanţele micromoleculare. Procesul e numit *dializă* şi stă la baza funcţionării aparatului rinichiului artificial. Majoritatea membranelor biologice normale nu sunt permeabile pentru proteine;

c) substanţele ce formează soluţii coloidale nu se cristalizează la mărirea concentraţiei, dar generează precipitat amorf. Proteinele pot forma cristale numai în anumite condiţii, din soluţia-mamă;

d) soluţiile coloidale au o viscozitate mărită ce depinde de masa şi forma moleculelor. Proteinele de aceeaşi masă moleculară, dar cu molecule asimetrice, au o viscozitate mult mai mare. Substanţele coloidale interacţionează cu apa. În proteine grupele ionogenice leagă apa: COOH - 4 molecule de H_2O, NH_2- 3 molecule, OH şi NH - cîte 2 molecule;

e) viteza de difuziune e foarte mică. Difuzia este procesul sumar de transfer al moleculelor dizolvate sub influenţa gradientului de concentraţie. Coeficientul de difuzie depinde de mărimea şi forma moleculelor, de rezistenţa determinată de viscozitatea solventului. Procesul de difuzie constituie baza funcţionării celulei, transferului de substanţe. Viteza difuziei şi distanţa la care pot fi transportaţi diferiţi metaboliţi în celulă sunt parametrii principali ce limitează metabolismul în celulele vii şi organitele lor;

f) soluţiile coloidale în concentraţii mari au o presiune osmotică mică. Ea depinde de numărul particulelor dizolvate în unitate de volum, dar nu de natura lor;

g) au tendinţa de a forma diferite complexe moleculare;

h) sunt capabile de absorbţie şi singure se supun absorbţiei;

i) se tumefiază şi se coagulează.

Soluţiile coloidale capătă forma de *sol* — soluţie lichidă cu o anumită fluiditate şi compoziţie de *gel*, pierzîndu-şi fluiditatea din cauza formării structurii de reţea internă cu fixarea apei. Atare structuri apar: 1) la tumefierea xerogelului (agar-agar, clei, gelatină); 2) în urma polimerizării fibrinogenului; 3) în urma condensării amidonului, gelatinei.

La învechirea gelului are loc *sinereza,* proces de expulzare a apei datorită contracţiei structurilor formate din particulele coloidale şi eliminarea solventului imobilizat. Apa inclusă în reţeaua structurală e numită imobilizată, pe cînd apa structurală e legată de grupele hidrofile interne ale macromoleculei proteice. Sinereza are loc la coagularea sîngelui, în procesul de retracţie a cheagului.

Proprietăţile electrochimice

Proteinele sunt amfoliţi macromoleculari, înglobînd un număr redus de grupări acide şi bazice. Contribuţia cea mai importantă o au resturile de glutamil, aspartil, lizil, arginil şi histidil. Resturile aminoacide de la capetele C şi N terminale nu au o influenţă semnificativă, mai ales cînd lanţul polipeptidic este mai lung. Grupele ionizate sunt dispuse în interiorul suprafeţei moleculare.

Proprietăţile acido-bazice sunt determinate de numărul mare de grupe ionizate ale resturilor de aminoacizi. De predominarea lor depind proprietăţile electrice. În albumină există 109 resturi de COOH şi 120 de NH_2; hemoglobina conţine 48 COOH şi 48 NH_2. Sarcina electrică e determinată de structura proteinei.

Moleculele proteice, fiind electroliţi amfoliţi, interacţionează cu acizii şi cu bazele,

participă la menținerea pH. În intervalul 6-7 al pH capacitatea-tampon a proteinelor e foarte mică. Numai aminoacidul histidina posedă proprietăți tampon la valori normale ale pH. Hemoglobina (Hb) eritrocitelor, transferînd O_2, se caracterizează prin conținut evident de histidină, de aceea și are Hb - aceste proprietăți - tampon la pH = 7.

Particulele proteice în soluție pot să-și schimbe sarcina electrică în dependență de pH. În soluție acidă are loc inhibarea disociației COOH și, avînd sarcina pozitivă, proteina migrează spre catod, în soluție bazică invers — spre anod.



pH - soluției, în care proteina apare cu o sarcină electrică nulă, numărul grupărilor (+) este egal cu acela al grupărilor (-), este denumit *pH izoelectric* sau *punct izoelectric (pI)*. Valoarea pI depinde de compoziția proteinei în aminoacizi. O proteină ce are surplus de lizină și arginină denotă un pI >7, iar aceea care are o proporție mare de aminoacizi dicarboxilici - pI < 7.



În tabelele 1.4. și 1.5. sunt date valorile pI ale unor aminoacizi și ale unor proteide.

La pH izoelectric solubilitatea, mobilitatea proteinei în cîmpul electric este minimă; pentru fiecare proteină e caracteristic pI propriu. Valoarea lui e determinată de numărul de grupe ionizate și de valoarea constantelor de ionizare (ribonucleaza — 7,8; citocromul — 10,6; pepsina —1,0). În pI molecula proteică e cu sarcină nulă și între moleculele învecinate nu apar forțe electrostatice de respingere, ceea ce înseamnă că în atare condiții soluțiile sunt nestabile.

Tabelul 1.4. ***Valorile punctului izoelectric pentru unii aminoacizi proteinogeni***

Aminoacid	pI	Aminoacid	pI
Acid L-aspartic	2,77	L-Valina	5,96
Acid L-glutamic	3.22	L-Leucina	5,89
L-Cisteina	5,07	L-Izoleucina	6,00
L-Cistina	5,66	L-Glicocol	5,97
L-Tirozina	5,66	L-Alanina	6,00
L-Serina	5,08	L-Prolina	6,30
L-Fenilalanina	5,48	L-Histidina	7,59
L-Triptofan	5,89	L-Lizina	9,74

Tabelul 1.5. ***Valorile punctului izoelectric pentru diferite proteide***

Proteide	pI	Proteide	pI
Pepsina	1,0	Fibrinogen	5,5
Cazeina	4,6	γ - globulina serică	6,7
Ovalbumina	4,6	Hemoglobina	6,9
Albumina serică	4,9	Mioglobina	7,0
Ureaza	5,0	Chimotripsinogen	9,5
Insulina	5,4	Citocrom C	10,6
Miozina	5,4	Lizozim	11,0

Evident că prezența sarcinilor antipode pe segmentele distanțate ale particulelor creează condiții pentru o agregare rapidă cu formarea agregatelor mari. Acest lucru favorizează precipitarea lor şi la asemenea valori ale pH au o solubilitate mică. Astfel de particularitate este caracteristică mai ales proteinelor globulare.

La valori mai mici sau mai mari de pI toate moleculele au aceeaşi sarcină şi, ca rezultat, se resping una pe alta, agregarea fiind imposibilă. Aşadar, *sarcina electrică e un factor stabilizant al soluțiilor coloidale.* În soluții supraacide sau suprabazice proteina nu va precipita chiar la fierbere, adică nici chiar atunci cînd îşi va pierde proprietățile hidrofile. Se ştie că un *factor stabilizator al soluțiilor coloidale e membrana apoasă.* Solubilitatea proteinelor e dependentă de hidratarea moleculară a lor, adică a grupelor ionizate. Apa, joncționîndu-se de pe suprafața moleculelor şi cuplîndu-se sub o formă de dipoli, formează membrana apoasă care împiedică adiția, fuzionarea particulelor coloidale şi în punctul pI.

Apa specific orientată în jurul grupelor hidrofile e numită *apă legată* şi se caracterizează prin :

a) dispunere mai compactă, ce o apropie de un corp solid;

b) proprietăți reduse de solvent;

c) nu îngheață la temperaturi joase;

d) constanta dielectrică este egală cu 2,8, pe cînd la apa obişnuită este de 8 (constanta dielectrică este forța de atracție a ionilor încărcați opus). *Prin urmare, factorii stabilizatori ai sistemului coloidal sunt sarcina electrică şi membrana apoasă.*

Precipitarea şi denaturarea proteinelor

Pentru aplicarea acestor proprietăți ale moleculei proteice e necesar de a o lipsi anume de stabilizatori. Metodele sunt diferite. În medicină ele sunt folosite pentru caracteristica cantitativă şi calitativă a proteinelor, din componenți biologici: urină, sînge, exudat etc.

Înlăturarea sarcinii electrice se efectuează prin aducerea proteinei la starea pI. Dacă drept ion de precipitație se foloseşte cationul, precipitarea e mai favorabilă în soluție slab

alcalină; dacă e folosit anionul, atunci soluția trebuie să fie puțin acidă — pentru a aduce particulele coloidale în starea electroneutră.

Membrana apoasă poate fi înlăturată cu ajutorul dehidratanților (alcool, acetonă). Ultimii leagă apa. Dehidratanții au o constantă dielectrică mică, micșorînd-o și pe cea a soluției. În consecință, ei măresc atragerea între două sarcini antipod, creînd astfel condiții pentru formarea perechilor de ioni ce favorizează agregarea proteinelor.

Corpurile proteice constituie o conformație nativă și posedă anumite calități fizico-chimice și biologice în condiții normale ale T, pH etc. Conformațiile sunt extrem de fragile și ușor perturbabile sub acțiunea multor agenți, care afectează interacțiunile covalente din conținutul moleculei. *Modificările conformației native unice se numește* ***denaturare****, iar agenții care o provoacă — agenți denaturanți.* Denaturarea e o particularitate a proteinelor.

La denaturare sunt lezate legăturile necovalente; agenții denaturanți nu afectează legăturile covalente, nu sunt lezate nici joncțiunile peptidice, nu se elimină aminoacizi. Structura primară a proteinei rămîne neafectată.

Trăsăturile caracteristice ale proteinei denaturate:

1) pierderea sau micșorarea activității biologice;

2) micșorarea solubilității;

3) schimbarea formei și mărimii moleculelor;

4) modificarea caracterului dispersiunii razelor Roentghen;

5) creșterea reactibilității unor grupe (SH);

6) apariția unor grupe funcționale anterior nedeterminate;

7) pierderea capacității de a se cristaliza;

8) scăderea capacității de rezistență la hidroliză;

9) capacitatea sporită de a da reacții de culoare;

10) micșorarea mobilității electrice.

Denaturarea este provocată de diferiți agenți: temperatura înaltă, săruri ale metalelor grele care în concentrații mici produc denaturarea, coagularea proteinei. Proteina coagulată din soluție se leagă și se precipită cu factorul nociv. Fenomenul e utilizat în practica medicală. La intoxicație cu sublimat bolnavului i se administrează lapte, ovalbumină în cantități mari. Proteina formează, în ansamblu cu substanțele toxice, un precipitat ce micșorează absorbția lui. În unele condiții proteina denaturată poate rămîne în soluție, dacă aceasta este acidă sau alcalină, chiar și la temperatura de 100^{0}C. Precipitatul va apărea la neutralizarea soluției.

La o acțiune de scurtă durată și la eliminarea rapidă a agentului denaturant e posibilă **renaturarea** proteinei cu restabilirea activității ei biologice. Denaturarea e ireversibilă atunci cînd se rup legăturile chimice, în special cele disulfidice inter- și intracatenare.

În procesul de sterilizare are loc denaturarea termică și, în consecință, insuficiența de timp sau de t^0 duce la generarea și răspîndirea microbului etc.

Multe proteine nu se denaturează la sublimare *(liofilizare)*. Totuși, unele enzime își diminuează activitatea. E necesar să știm că există substanțe ce pot împiedica denaturarea, și anume: soluția de glucide simplă saturată, alcooli multiatomi (glicerina), unii anioni organici (dodecilsulfat, unii acizi grași) etc. Pentru a evita denaturarea proteinele se izo-

lează. Ele se păstrează la rece, în soluții concentrate de săruri și la un pH anumit.

Metodele de identificare a proteinelor. *Problema elucidării complete a structurii macromoleculare* a proteinelor este una dintre cele mai actuale și de o incontestabilă importanță teoretică și practică. Pentru ***determinarea masei moleculare proteice*** pot fi utilizate următoarele metode: mărimea presiunii osmotice, constanta ultracentrifugării (proteinele sedimentează în raport cu mărimea și masa lor); metoda difuziunii luminii (intensitatea difuziunii e dependentă de numărul particulelor și de masa lor moleculară); mărimea difracției razelor Roentghen, microscopia electronică; conținutul unor elemente (în Hb concentrația Fe este egală cu 0,34%), care se conțin în cantități mici (în albumina serică concentrația triptofanului e de 0,58%).

$$\text{Masa moleculară minimă a proteinei} = \frac{\text{Masa atomului x 100}}{\text{Cantitatea elementului în \%}}$$

$$\text{Masa moleculară a albuminei (Trp)} = \frac{204 \text{ x } 100}{0,6} = 34000 \text{ Da}$$

$$\text{Masa moleculară a hemoglobinei (Fe)} = \frac{56 \text{ x } 100}{0,34} = 16470 \text{ Da}$$

Stabilirea structurii unei proteine începe cu izolarea și purificarea ei, determinarea masei moleculare, identificarea calitativă și cantitativă a aminoacizilor componenți, modului lor de legare, secvența aminoacizilor, în fine, cu orientarea tridimensională a macromoleculelor.

1. Proteinele se separă de celelalte componente prin dializă, utilizîndu-se membrane semipermeabile. Pentru accelerarea procesului se aplică electroliza — electrodializă.

2. Soluțiile proteice se purifică, diferențiindu-se după mărime și formă prin filtrarea cu geluri speciale care funcționează ca site moleculare — moleculele de mărimi mici se repartizează între faze, iar cele mai mari nu pătrund în faza internă. Moleculele asimetrice pot să nu pătrundă în faza internă. (Granulele porozitate de gel sunt suspendate într-o soluție, formînd 2 faze - una internă — în granule, și alta externă — în afara lor). În cazuri aparte la purificarea unor enzime se pot utiliza și alte metode. Se observă afinitatea lor cu diverși ioni, grupe funcționale — cromatografia de afinitate (fig.1.15 a,b,c).

a) *Cromatografia prin schimbători de ioni* este bazată pe distingerea semnului și sarcinii electrice la pH-ul dat. Coloana matrice prezintă un polimer sintetic ce conține grupări fixate. La legarea grupărilor anionice matricea este schimbătoare de cationi, iar la fixarea grupărilor cationice — schimbătoare de anioni. Afinitatea proteinei pentru grupările fixate în coloană este influențată de pH (starea ionizantă a moleculei) și de concentrația ionilor salini din mediul respectiv. Separarea poate fi optimizată prin schimbarea succesivă a pH-lui și /sau a concentrației saline a fazei mobile.

b) *Gel - filtrarea* separă proteinele în dependență de dimensiuni. Matricea coloanei prezintă un polimer fixat ce conține pori cu anumite mărimi. Proteinele mari migrează mai

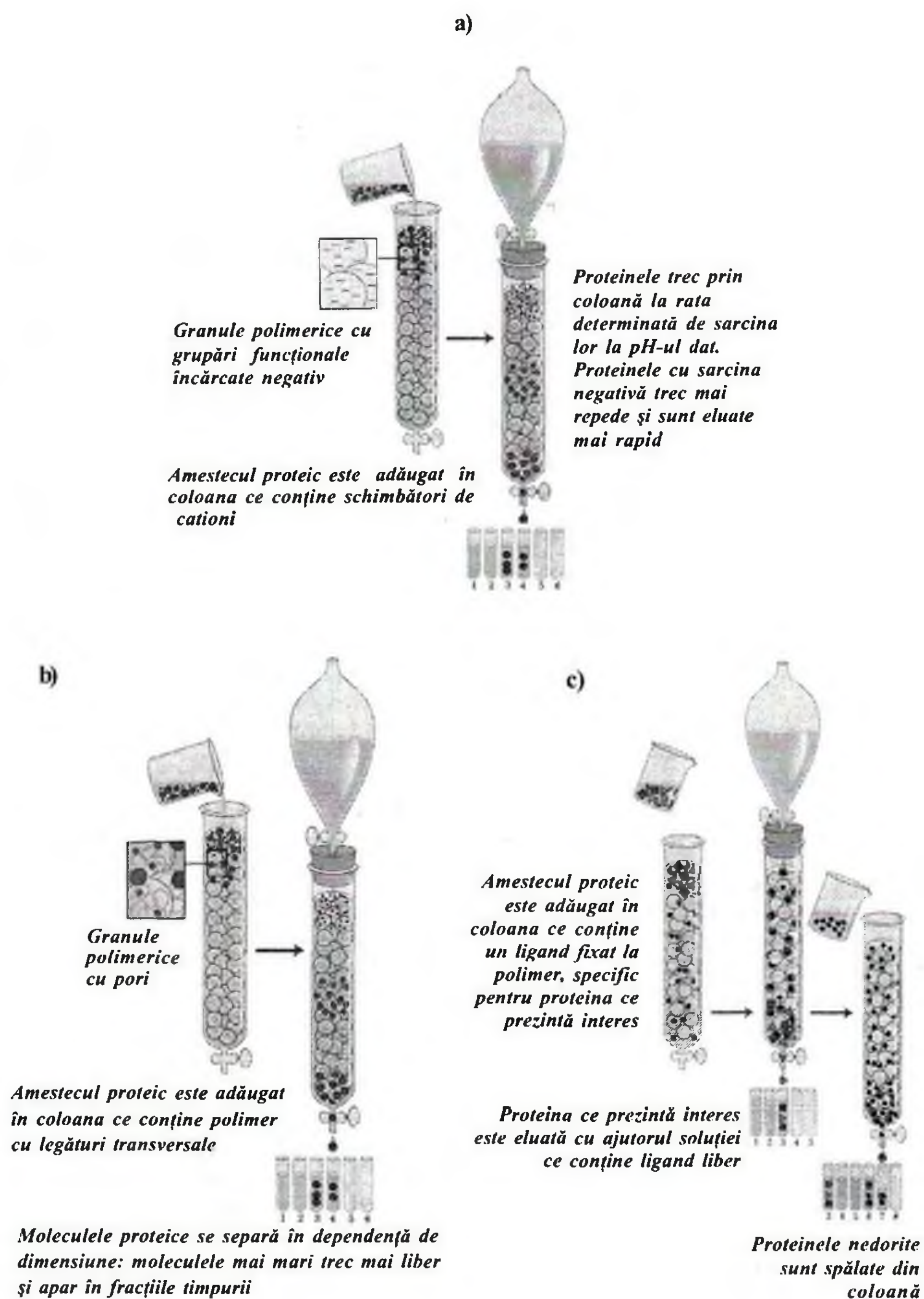


Figura 1.15. *Metode cromatografice utilizate pentru purificarea proteinelor:*
a) cromatografia prin schimbători de ioni; ***b)*** *gel-filtrarea;* ***c)*** *cromatografia de afinitate*

rapid decît cele mici (nu pătrund în porii granulelor). Proteinele mai mici intră în pori, sunt reținute, avînd o cale mai lungă de traversat.

c) *Cromatografia de afinitate* separă proteinele în dependență de specificitatea lor de legare. Proteinele reținute în matrice sunt fixate specific de liganzi prin legături transversale (termenul «ligand» se referă la o grupă sau o moleculă care se leagă de macromolecule de tip proteic). După eluarea proteinelor nefixate în coloană, proteina legată de interes particular este eluată prin intermediul unei soluții ce conține ligand liber.

În știința contemporană este pe larg utilizată *metodă elecroforezei* (fig 1.16a). Diferite probe sunt introduse în rezervoarele ce conțin gel de poliacrilamidă. Proteinele trec în gel, unde este aplicat un cîmp electric. După cîteva ore de la efectuarea elecroforezei, proteinele pot fi vizualizate prin tratarea gelului cu diferiți coloranți (albastru de metilen), care se fixează de proteine, dar nu la gel. Fiecare bandă din gel reprezintă o proteină individuală. Proteinele mai mici migrează mai rapid și sunt depistate mai departe de baza gelului. În fugură este ilustrată purificarea enzimei RNA polimeraza din *E.coli.* Prima bandă corespunde proteinelor prezente în extractul celular nativ.

Necesitățile științifice impun utilizarea elecroforezei cu cromatografia verticală sau focalizarea izoelectrică — *electroforeză bidimensională.*

În focalizarea izoelectrică (fig.1,16 b), tehnica modernă permite separarea proteinelor în dependență de punctul lor izoelectric (tab.1.5).

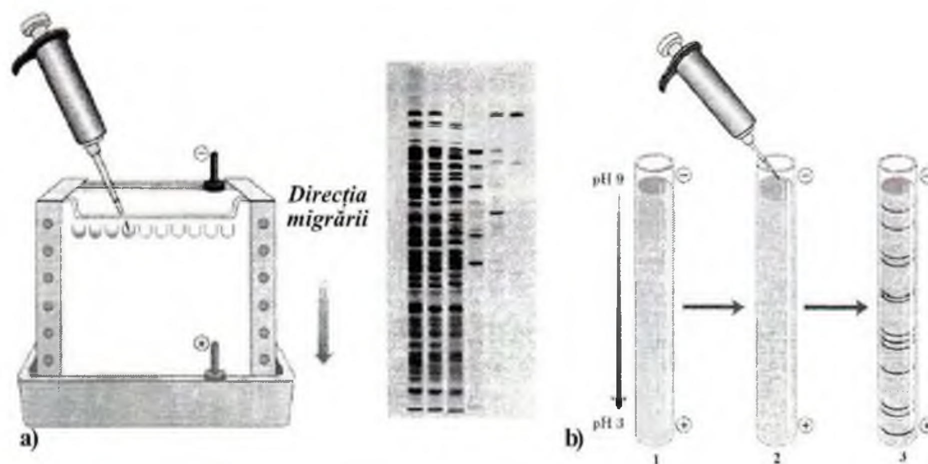


Figura 1.16. ***Metode utilizate pentru purificarea proteinelor: a) electroforeza, b) focalizarea izoelectrică***

Un gradient constant al pH-lui este stabilit în gel prin adausul amfoliților potriviți (1). Amestecul proteic este plasat într-un rezervor în gelul la care se aplică un cîmp electric (2). Proteinele pătrund în gel și migrează pînă ce fiecare atinge pH-ul echivalent pI propriu (3). Amintim că atunci cînd pH este egal cu pI, sarcina netă a proteinei este egală cu zero. În figură sunt arătate proteinele după colorație, care sunt distribuite de-a lungul gradientului pH-lui în dependență de valoarea pI.

În electroforeza bidimensională (fig.1.16c) proteinele inițial sunt separate prin focalizarea izoelectrică într-un gel cilindric. Apoi gelul este amplasat orizontal pe un alt gel în formă de placă, unde proteinele sunt separate prin elecroforeză în gel de



Figura 1.16. *c) elecroforeză bidimensională*

poliacrilamidă. Separarea orizontală reflectă diferențele de pI, iar cea verticală — masa moleculară. Utilizînd această tehnică, pot fi separate mai mult de o 1000 de diverse proteine din *E. coli.*

Mobilitatea electroforetică a proteinei în gel de poliacrilamidă poate fi utilizată şi în determinarea masei moleculare (fig.1.17).

Proteinele standarde cu masa moleculară cunoscută sunt supuse electroforezei. Aceste proteine - marker (1.17a) pot fi utilizate pentru a estima masa moleculară a proteinelor necunoscute.

În (1.17b) este redată dependența logaritmului masei moleculare a proteinelor marker versus migrației relative la o electroforeză liniară. Graficul respectiv permite determinarea masei moleculare a proteinei necunoscute. La moment sunt cunoscute metode mult mai sofisticate de purificare şi apreciere structurală a proteinelor.

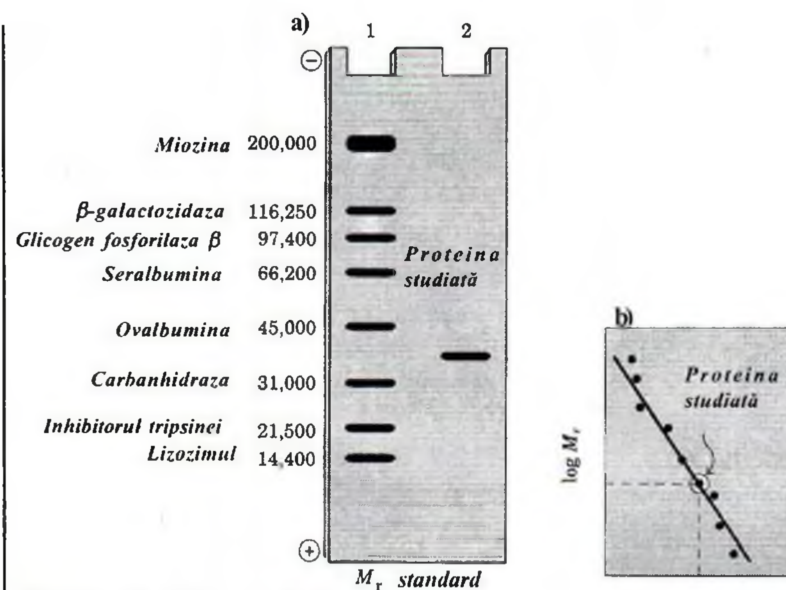


Figura 1.17. *Estimarea masei moleculare*

ENZIMELE

Istoria biochimiei este, în primul rînd, istoria studierii enzimelor — celor mai distinctive şi specifice proteine cu proprietăţi catalitice.

Enzimologia e demult considerată o ştiinţă aparte şi s-a dezvoltat efectiv în ultima perioadă de timp, dar începuturile ei se atestă din primele decenii ale secolului al XIX-lea.

Dacă în 1920 erau estimate 10-15 enzime prin observarea efectului acţiunii lor, astăzi sunt caracterizate parţial peste 2000 enzime, dintre care circa 500 au fost obţinute sub forma unor preparate perfect purificate (unele cristaline) şi studiate din punct de vedere fizico-chimic şi biologic.

Manifestările acţiunii enzimelor (fermentaţia, digestia) erau cunoscute de foarte mult timp, dar explicaţia mecanismului acestor procese complexe, rolul şi locul enzimelor în transformările substanţelor celulare rămîneau neelucidate. Un şir de mecanisme sunt şi pînă astăzi nedefinite.

Definiţia enzimei s-a conturat atunci cînd s-a observat că în sistemele biologice au loc procese catalitice survenite din extractele de orz germinal ce realizează hidroliza amidonului. Cu ajutorul precipitării repetate cu alcool etilic s-a obţinut (1833) o pulbere albă — extrem de termolabilă — diastaza (din greceşte *didotabis* - separare).

În perioada 1834-1837 savantul suedez J.Berzelius formulează conceptul de cataliză, conform căruia un catalizator măreşte viteza reacţiilor chimice şi rezultă la sfirşitul lor nemodificat — cantitativ şi calitativ. El sugerează că diferitele fenomene biologice (fermentaţia, digestia) pot fi explicate prin prezenţa unor catalizatori biologici specifici materiei vii. În 1860, L.Pasteur stabileşte că fermentarea zahărului de drojdii în spirt e catalizată de "fermenţi organizaţi indispensabil de organismele implicate în procesele fermentative".

Această concluzie era în contradicţie cu postulatul lui J.Liebig, care considera că fermentul e solubil, fiind produs de celula vie şi nu constituie celula propriu-zisă.

În anul 1877, W.Kuhne propune termenul **enzimă** (de la grecescul *enzyme* — "în drojdii") pentru atare grupă de substanţe. O fierbere aparentă cauzată de "ferment" (în latină *fervere* — a fierbe), cu degajarea CO_2 în procesul fermentativ, caracterizează aceste fenomene biologice.

Celebra dispută ştiinţifică Pasteur — Liebig a fost finalizată cu brio în 1897, de către H. şi E.Buchner, care au demonstrat că sucul celular al unei culturi de drojdii conservează întreaga activitate fermentativă, proprie acestui microorganism.

În ultimii ani ai sec.XIX, E.Fischer, efectuînd studii asupra unor enzime hidrolitice, a specificităţii enzimelor, elaborează teoria interacţiunii enzimă-substrat. Această teorie a stimulat cercetările în acest domeniu.

Epoca modernă începe o dată cu izolarea, purificarea şi cristalizarea primelor enzime. În 1926, J. Sumner a cristalizat ureaza şi a determinat că enzimele totalmente sunt de natură proteică. El înaintează conceptul că toate enzimele sunt proteine, dar savantul german Richard Willstätter, o adevărată somitate în materie, confirmă că enzimele sunt substanţe cu o greutate moleculară mică, iar proteina depistată e o simplă murdărie.

Mai tîrziu, J.Northrop, împreună cu colaboratorii săi, cristalizează *pepsina* şi *tripsina*, confirmînd astfel că şi ele sunt proteine. Aşadar, natura proteică e stabilită incontestabil. S-au început studii intensive în acest domeniu, ce au dat rezultate remarcabile. Cu toate acestea, o serie de întrebări, cum ar fi: de ce proteinele joacă rol de catalizatori; care este cauza că molecula enzimei e mult mai mare decît a substratului; de ce aminoacizii nu posedă proprietăţi similare, dar unite în lanţ polipeptidic capătă proprietăţi catalitice; în ce mod are loc reglarea activităţii enzimelor — toate aşteaptă răspunsuri explicite.

Ce sunt enzimele?

Enzimele sunt unităţi funcţionale ale metabolismului celular. Acţionează strict într-o anumită consecutivitate. Catalizează sute de reacţii în lanţ, finalizînd cu eliberarea moleculelor din substanţe nutritive. Energia substanţelor reagente trece dintr-o formă în alta cu o eficacitate mare şi se acumulează în ATP ce este utilizat în procesele vitale.Din micile biomolecule se asamblează macromoleculele celulei.

O grupă deosebită sunt *enzimele reglatoare*, care sesizează diferite semnale perfect metabolice şi, respectiv, îşi modifică activitatea catalitică. Datorită acestor enzime în celulă totul e coordonat: e garantat un echilibru armonios dintre procesele metabolice necesare pentru menţinerea integrităţii şi, în final, a vieţii celulelor, viabilităţii sistemului şi al întregului organism.

Insuficienţa sau lipsa completă a unuia sau a mai multor fermenţi duce la apariţia diferitelor afecţiuni ereditare; diferite stări patologice apar la o activitate excesivă a uneia sau a mai multor enzime. Şi o dată cu elaborarea unui preparat medicamentos care ar regla activitatea acestor enzime, vom trata eficient boala.

Enzimele joacă un rol important la stabilirea diagnosticului, determinînd activitatea lor în lichidul biologic. În industria chimică şi alimentară evaluarea enzimelor este utilizată pe larg. Enzimele au un rol aparte şi în agricultură.

Structura enzimelor

Enzimele sunt proteine şi posedă toate proprietăţile fizico-chimice specifice acestor macromolecule (solubilitate, proprietăţi osmotice, sarcină electrică netă, denaturare termică, reacţii chimice etc.). Activitatea lor e dependentă de păstrarea structurii native a proteinei. Confirmările experimentale ale acestui postulat sunt:

1. Distrugerea lanţului polipeptidic prin fierbere în soluţii acide sau prelucrarea lui cu tripsină duce la pierderea activităţii catalitice. Pentru menţinerea ultimei e necesară păstrarea structurii primare.

2. Modificările în împachetarea lanţului polipeptidic (încălzind proteina sau acţionînd cu pH de valori extreme, cu agenţi denaturanţi) cauzează pierderea activităţii catalitice, ceea ce indică necesitatea menţinerii structurii secundare şi terţiare a proteinei.

Masele moleculare ale enzimelor variază în limite foarte largi. *Ribonucleaza* are o masă moleculară egală cu 13700Da. Limita superioară este greu de definit. Numeroase enzime sunt alcătuite numai din resturi de aminoacizi unite între ele prin legături covalente, peptidice şi nu doar printr-un lanţ, ci prin mai multe lanţuri polipeptidice.

Unele enzime sunt asociate cu compuşi de mase moleculare mici, dializabili. Cînd aceşti compuşi organici sunt strîns legaţi în structura enzimei, ei poartă denumirea de *grupări prostetice,* însă cînd îmbinarea lor este usor disociabilă — *coenzime.*

Aceşti biocatalizatori se numesc *holoenzime*, iar componenta proteică — *apoenzime*. Pentru totalitatea compuşilor neproteici din structura heteroenzimelor se utilizează termenul *cofactor*. În calitate de cofactori apar frecvent cationii unor metale şi foarte rar unii anioni. Un număr relativ redus de cofactori, de coenzime în asociere cu diferite apoenzime dau naştere unui număr foarte mare de *heteroenzime*. Se atestă sute de dehidrogenaze cu coenzima NAD^+. Datorită legăturilor foarte slabe între NAD^+ şi diverse apoenzime, un numar mare pot acţiona simultan într-un compartiment celular, utilizînd o cantitate neînsemnată de coenzime. Şi în aceste situaţii este absolut necesar ca procesele de reducere să fie echilibrate cu reoxidarea lor.

Ce e comun şi ce e distinct la cataliza enzimatică şi cea chimică?

Enzimele sunt catalizatori şi respectă legile catalizei:

1. Enzimele accelerează viteza reacţiilor chimice posibile din punct de vedere termodinamic, determinînd o scădere a energiei de activare şi conducînd la instaurarea mai rapidă a stării de echilibru; accelerează reacţiile în ambele direcţii în mod identic $A \rightleftharpoons B$.

În lipsa enzimei viteza ($A \rightarrow B$) e egală, de exemplu, cu 10^{-4} sec., reacţia inversă ($A \leftarrow B$) decurge în 10^{-6} sec.

Constanta acestei reacţii este egală:

$$C = \frac{[B]}{[A]} \times \frac{Cd}{Ci} = \frac{10^{-4}}{10^{-6}} = 100$$

În stare de echilibru concentraţia substanţei B este de 100 ori mai mare decît a substanţei A, chiar dacă e prezentă sau nu enzima. În lipsa enzimei echilibrul se stabileşte timp de cîteva ore, iar cu enzima — în cîteva secunde. Enzimele accelerează apariţia echilibrului chimic în reacţia catalizată.

2. Viteza reacţiei creşte de milioane de ori. De exemplu, reacţia catalizată de carbanhidrază: $CO_2 + H_2O \rightleftharpoons H_2CO_3$

Fiecare moleculă de enzimă hidratează în 1 sec.- 10^5 molecule de CO_2 şi, prin urmare, viteza reacţiei în prezenţa enzimei creşte de 10^7ori.

Efectul enzimelor e extraordinar în comparaţie cu cel al catalizatorilor sintetici. Enzimele se prezintă în concentraţii extrem de mici la concentraţii de substrat relativ mari. Eficienţa catalitică a enzimei este net superioară celei înregistrate în cazul catalazei chimice, exprimîndu-se prin *numărul de turnover* — numărul de molecule ale substratului transformat într-un minut de o moleculă de enzimă.

3. La sfîrşitul reacţiilor chimice enzimele, la fel ca şi catalizatorii, se regăsesc, din punct de vedere cantitativ şi calitativ, într-o stare chimică neschimbată, participînd la un nou act catalitic.

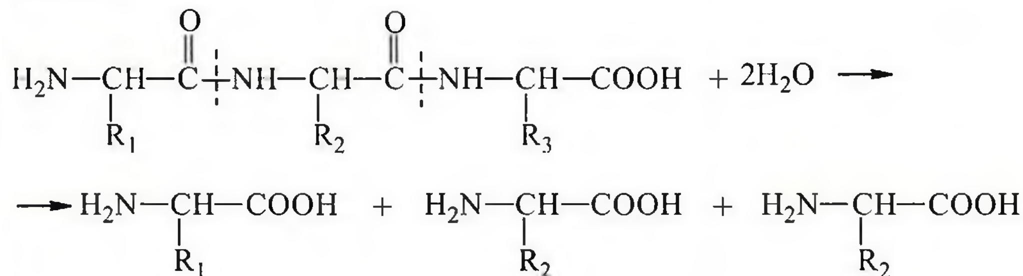
4. Enzimele sunt substanţe macromoleculare extrem de instabile, reacţionînd în condiţii optime numai la anumiţi parametri - parametri optimi de acţiune a enzimei — soluţii apoase diluate, pH valorii fiziologice, T anumită şi presiune adecvată.

SPECIFICITATEA ENZIMELOR

Cea mai importantă prioritate a enzimelor e înalta lor specificitate de acțiune - atribut fundamental ce determină succesiunea reacțiilor care favorizează calea metabolică.

Multitudinea formelor de manifestare a specificității poate fi încadrată în 2 categorii - cea de reacție și de substrat.

1. Specificitatea de reacție este proprietatea de a cataliza un anumit tip de reacție ce stă la baza clasificării enzimelor. Enzimele proteolitice catalizează hidroliza legăturilor peptidice:

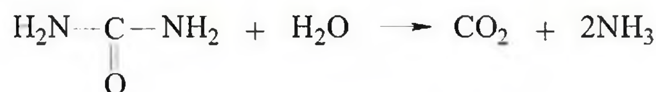


Multe enzime catalizează și hidrolizează legăturile esterice, reacția fiind asemănătoare.



Unele enzime au 2 zone distincte în structura lor proteică, fiecare responsabilă pentru un anumit tip de reacție specifică.

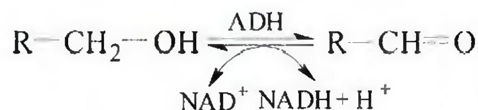
2. O enzimă cu o anumită particularitate de reacție poate asigura transformarea corespunzătoare a unui grup de substanțe înrudite chimic — **specificitate relativă,** sau reacția se resfrînge asupra unui substrat — **specificitate absolută.** Drept exemplu de specificitate absolută pot servi anhidraza carbonică, ureaza, ultima reprezentînd o enzimă ce catalizează următoarea reacție :



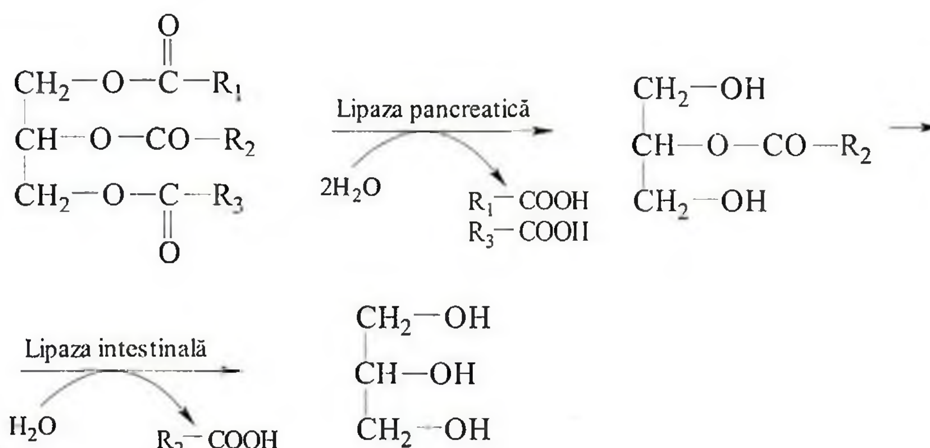
Specificitatea relativă se manifestă în diferite ipostaze:

a) posedă o arie largă, față de numărul substraturilor (proteazele în funcție de resturi de aminoacizi: chimotripsina — legătura peptidică, formată de COOH a Phe, Tyr, Trp; tripsina - de COOH ai Lys și Arg; trombina — de COOH ai Arg și NH_2 ai Gly);

b) formează o arie mai îngustă: alcool dehidrogenaza — dehidrogenază un grup de alcooli monohidroxilici cu un număr mic de atomi de C (specificitatea de grup), adică se manifestă prin gruparea chimică:



c) în lipazele digestive specificitatea corelează cu poziția legăturii esterice între glicerină și acizii grași:



Stereospecificitatea de substrat și de reacție

Majoritatea biomoleculelor posedă un atom de C asimetric și, fiind chirali, pot exista sub forma celor 2 enantiomeri. O enzimă atacă numai un izomer — *stereospecificitate*:

a) în toate reacțiile glicolitice enzima corespunzătoare acționează asupra esterilor fosforici ai D-hexozelor și D-triozelor; se utilizează numai L-aminoacizii; în aceste cazuri substratul optic activ se transformă în produs care poate fi sau nu optic;

b) cînd substratul este inactiv optic, dar este produsul optic al reacției, se consideră că reacția este o "sinteză asimetrică". Aceeași situație se observă și în activitatea fumarazei, SDH, LDH:



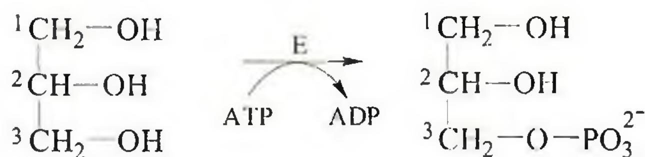
c) enzimele catalizează transformările doar a unui singur izomer - cis sau trans;

d) pentru a utiliza ambii antipozi optici, organismul dispune de racemaze (*epimeraze*), care transformă un izomer în altul:



Utilizindu-se substraturi marcate cu izotopi radioactivi, s-a constatat că unele enzime sunt capabile să diferențieze două grupe chimice identice.

Glicerol kinaza fosforilează asimetric glicerolul, esterificînd aceeași grupă de alcool primar:



Enzimelor le sunt proprii manifestări absolut specifice, anumite substraturi. Ele accelerează diverse reacții chimice, fără formarea produselor auxiliare. Moleculele substratului trebuie să posede anumite particularități structurale de bază:

a) substratul conține o legătură chimică specifică pe care enzima o scindează;

b) substratul trebuie să posede o anumită grupă funcțională, grupa de legătură, care joncționează cu enzima și orientează moleculele substratului în centrul activ. Cu alte cuvinte, legătura chimică a substratului trebuie să ocupe o poziție adecvată față de grupa catalitică a enzimei.

Ce mecanism de accelerare a vitezei reacției chimice posedă enzimele?

Pentru a pătrunde acest mecanism, e necesară conștientizarea unor noțiuni ca: energia de activare exprimată în calorii, energie necesară tuturor moleculelor unui mol de substanță, care la o anumită temperatură să atingă starea de tranziție corespunzătoare apexului barierei energetice. Factorul ce asigură desfășurarea reacțiilor în organismele vii la T⁰C internă constantă este delimitarea la valori minime a energiei de activare. Viteza reacțiilor e dependentă de diferența valorilor de energie liberă (ΔG) pentru starea A (s) și complexul de tranziție. Ea este egală cu: $\Delta G = Gst - Gs$. Se mai numește energie liberă de activare — Gibbs.

Viteza reacțiilor e proporțională cu numărul de molecule, a căror energie liberă este egală sau mai mare decît ΔG. O dată cu creșterea T, numărul moleculelor sporește de 2 ori la 10^0 C. Enzimele accelerează viteza reacțiilor chimice (VRC), micșorînd bariera de activare, și reacția decurge după alt mecanism, ce se caracterizează printr-o energie de tranziție mult mai mică (fig.1.15).

Formarea și scindarea legăturii chimice de enzimă e precedată de formarea *complexului enzimă-substrat* [CES]. Substratul e fixat de o zonă restrînsă în enzimă, specifică, denumită *"centrul activ"* al enzimei. Așadar, ***centrul activ (CA)*** *e o îmbinare în timp și spațiu a anumitelor grupe funcționale, ce intră în legătură cu moleculele substratului și determină activitatea catalitică a enzimei.*

Dispunem de numeroase investigații experimentale ce vizează formarea *complexului enzimă-substrat* (CES):

1.Investigații demonstrative prin intermediul microscopiei electronice și al analizei roentgenostructurale.

2.Formarea CES e însoțită de modificările fizice ale enzimelor: solubilitate, termolabilitate.

3. Se modifică și caracteristica spectroscopică, dacă în componența enzimei intră grupe prostetice colorante.

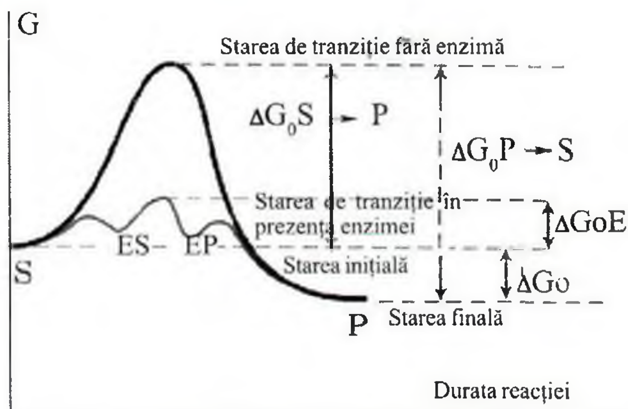


Figura 1.15. ***Diagrama ce reprezintă energia liberă de activare în reacțiile chimice: S-substrat A; P-produs final B; ES și EP- compuși intermediari, ΔGo - energia de reacție standard S→P***

4. Adecvată e şi metoda rezonanţei electronice de spin (RES) sau rezonanţa magnetică nucleară (RMN).

5. La formarea CES se manifestă un grad mare de stereospecificitate (D - aminoacizii nu pot servi ca substraturi, nu se leagă cu enzima). Zona de legătură are o formă geometrică bine conturată (fig. 1.16).

6. Uneori afinitatea mare a enzimei cu substratul A (în lipsa B) înlesneşte stabilirea complexului EA.

7. La concentraţia constantă a enzimei viteza reacţiei sporeşte o dată cu mărirea concentraţiei de substrat, ajungînd la viteza maximă.



Figura 1.16. *Fixarea substratului în centrul activ al chimotripsinei*

În 1913, L.Michaelis a explicat noţiunea de viteză maximă a reacţiei fermentative faţă de formarea CES. Concluzia că viteza reacţiei devine maximă la concentraţia mare a substratului, în condiţiile în care acesta ocupă toate centrele active ale enzimei, e o argumentare înrădăcinată demult şi o dovadă concludentă a funcţionării complexului enzimă-substrat.

Unele particularităţi ale centrului activ (CA)

Centrul activ este alcătuit dintr-un "centru de legare" şi un "centru catalitic". Mai exact, în centrul activ unele grupări (sau resturi ale aminoacizilor) sunt implicate în legarea substratului, altele asigură cataliza propriu-zisă, fiind "intercalate" ca grupe catalitice.

Enzimele conferă o varietate structurală destul de mare, la fel de vaste sunt specificitatea şi mecanismul acţiunii catalitice. Şi, totuşi, rezultă unele concluzii generale, referitoare la proprietăţile lor:

1. CA ocupă o parte relativ mică din volumul enzimei şi majoritatea din restul aminoacizilor moleculei de enzimă nu contactează cu substratul. E o enigmă solicitarea unor dimensiuni atît de mari de către enzime.

2. CA e o structură tridimensională (nu e doar punct, linie sau plan) — structură complexă, la formarea căreia participă grupe ale diferitelor resturi de aminoacizi (exemplu: în structura lizozimului, din cei 129 de aminoacizi radicalii aminoacizilor din secvenţa liniară — 35,52,62,63,101 participă la formarea CA). Centrele active ale unor enzime sunt redate în figurile 1.17-1.18.

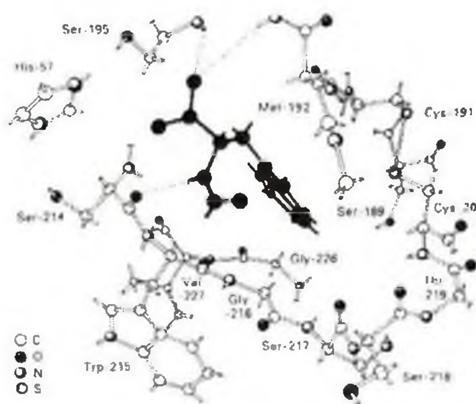


Figura 1.17. *Centrul activ al chimotripsinei*

3. Substratul relativ slab se leagă cu enzima. Energia liberă a interacțiunii e de 3-12 kcal/mol. Forța legăturilor covalente nu deviază de la limitele 50-110 kcal/mol.

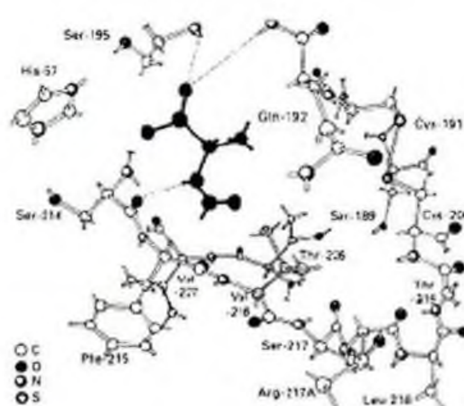


Figura 1.18. *Centrul activ al elastazei*

4. CA are formă de "adîncitură" sau "cavitate" (șanț, despicătură), unde apa n-are acces, cu excepția dacă aceasta servește drept reagent al reacției. Această cavitate conține cîtiva aminoacizi polari ce exercită legarea și cataliza. Regiunea CA are un caracter nepolar ce favorizează fixarea substratului. De menționat că forma CA creează un microspațiu, în care resturile polare capătă însușiri deosebite, necesare pentru cataliză.

5. Fixarea specifică e dependentă de poziția bine determinată a atomilor în CA. Substratul pătrunde în CA, cu condiția similitudinii de formă. În 1890, Emil Fischer a elaborat modelul "clasic" al structurii spațiale a CA în raport cu structura substratului. Anume acest principiu — *"lacăt - cheie"* — a contribuit cu succes la evoluția conceptului catalizei stereospecifice (fig.1.19).

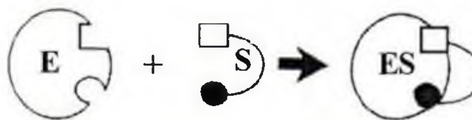


Figura 1.19. *Formarea complexului enzimă-substrat (ES) după modelul E.Fischer*

În ultimii ani însă s-a constatat că centrul activ nu e o structură rigidă cum presupunea E.Fischer, ci se modifică la fixarea substratului. *Modelul dinamic*, propus de D. Koshland, presupune o flexibilitate a zonei de cazare a CA în enzima liberă. CA este preformat, ceea ce denotă că are o conformație spațială puțin diferită de cea necesară fixării substratului. Substratul induce o "modificare conformațională" a zonei CA, realizînd o configurație optimă fixării (fig.1.19a).

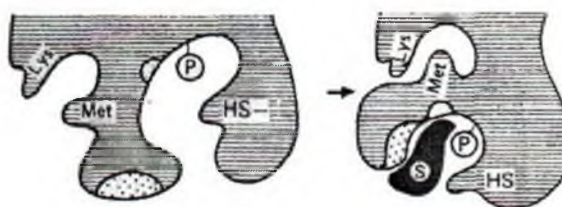


Figura 1.19a. *Modificările conformaționale în molecula enzimei la fixarea substratului (modelul D.Koshland)*

Unele enzime fixează substratul în forma lor tensionată, ce corespunde stării de tranziție.

Din punct de vedere termodinamic, situarea cea mai potrivită a substratului în raport cu enzima reduce la minim gradele de libertate ale translării și rotației substratului, îi micșorează entropia, ceea ce favorizează obținerea efectivă a stării de tranziție și motivează în mare parte scăderea energiei de activare a reacției catalizate enzimatic.

E incontestabil faptul că flexibilitatea structurii enzimei determină prezența substratului în sfera de acțiune a grupelor catalitice și ieșirea produsului din acest sistem.

Unele enzime induc o perturbaţie a electronilor pe substrat, amplificînd cu mult viteza catalizei (carboxipeptidază).

Există o varietate mare de ***factori ce influenţează viteza reacţiilor fermentative*** şi ***determină activitatea catalitică a enzimelor***:

1. Concentraţia fermentului:

a) în condiţii standard, 2 molecule de enzime într-o anumită perioadă de timp vor cataliza de 2 ori mai multe molecule de substrat decît o moleculă de enzimă $V = R[E]$ — o relaţie strict proporţională. La mărirea concentraţiei de enzimă se observă devieri de la relaţiile strict liniare — devieri imaginare ce ţin de metoda de studiu;

b) în prezenţa mai multor enzime, viteza va fi limitată de concentraţia uneia dintre ele;

c) o dată cu sporirea concentraţiei enzimei, viteza unei reacţii complexe se va micşora în cazul în care coenzima practic va fi legată de o enzimă inaccesibilă pentru celelalte;

d) adaosurile toxice pot fixa enzima. Numai după legarea lor, enzima va deveni aptă pentru activitate.

2. Concentraţia substratului. Concentraţia enzimei din ţesuturi suportă variaţii mici în timp (cu excepţia enzimelor "inductibile"), astfel încît ea poate fi considerată constantă.

În schimb, concentraţia substratului poate varia destul de mult conform stării metabolice a ţesutului. Dependenţa vitezei reacţiilor de concentraţia substratului constituie aspectul cel mai important al cineticii enzimatice (fig.1.20).

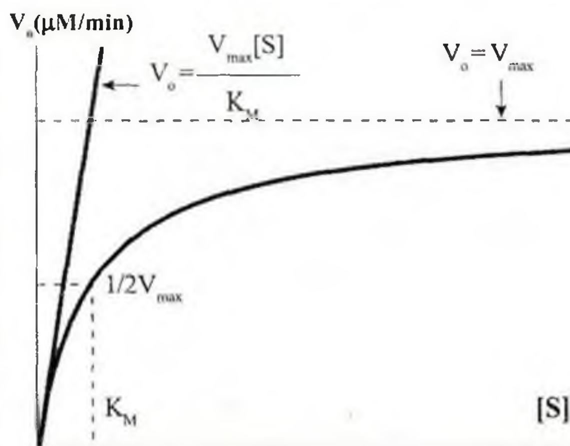


Figura 1.20. ***Variaţiile vitezei reacţiilor enzimatice în funcţie de concentraţia substratului***

Reprezentarea grafică reflectă o curbă cu afinităţi de hiperbolă. Explicarea ei se datorează lui L.Michaelis şi M.Menten. K_M este egală cu concentraţia substratului pentru care V_o prezintă o jumatate din V_{max}. Exprimarea K_M se face în unităţi de concentraţie şi se deduce din presupunerea de bază precum că factorul-limită al vitezei reacţiilor fermentative este scindarea complexului ES în produs şi enzimă. Fiecare enzimă în parte are valoarea K_M pentru substratul dat. Unele enzime (catalaza, carbanhidraza) cer cantităţi relativ mari de substrat pentru a atinge viteza egală cu V_o; altele (hexokinaza) ating mărimea dată la concentraţii mici de substrat.

Ecuaţia lui Michaelis-Menten.

$$V_o = \frac{V_{max}[S]}{K_M + [S]}$$

În condiţiile de mediu al celulei, enzima nu-i saturată cu substrat şi nu funcţionează cu V_{max}. Modificînd concentraţia substratului, e posibilă, în anumită măsură, reglarea proceselor oxidative din celulă.

3. pH optim al fiecărei enzime, ce generează o acţiune maximă a ei, nu coincide obligatoriu cu valorile pH caracteristice mediului intracelular al enzimei.

Mărind sau micşorînd pH-ul mediului, se poate regla activitatea catalitică a enzimelor. Acest optim pH e dependent de gradul de ionizare a grupelor funcţionale, al afinităţii enzimei cu substratul şi stabilităţii ei (fig.1.21).

Ionii H^+ şi OH^- au un efect denaturant asupra enzimelor — rup legăturile, ce determină structura terţiară. Dacă în CA al enzimelor se află grupări ionizabile, acide sau bazice, acestea interactionează direct cu ionii H^+ şi OH^-, rezultînd creşterea sau scăderea gradului lor de disociere şi acţionînd ca adevăraţi inhibitori ai enzimelor (amilaza în sucul gastric).

4. Influenţa temperaturii (T) determină stabilitatea şi viteza de scindare a complexului ES, influenţînd afinitatea enzimei la substratul activator sau inhibitor. Creşterea vitezei reacţiei o dată cu creşterea temperaturii este interpretată prin prisma "energiei de activare". Pentru fiecare enzimă se poate stabili o temperatură optimă, viteza atingînd valoarea maximă. Creşterea temperaturii cu 10°C pînă la 40°C dublează în continuare viteza reacţiei. Viteza scade din cauza distrucţiei enzimei, iar temperatura inactivaţiei enzimei coincide cu punctul de denaturare a proteinei (fig.1.22).

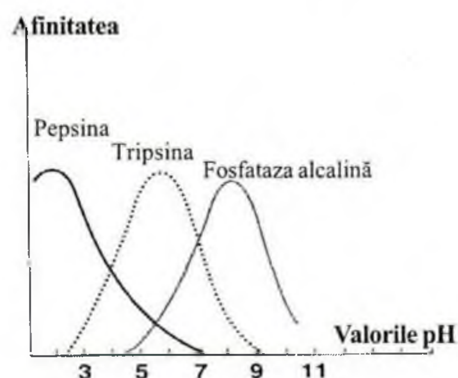


Figura 1.21. ***Activitatea unor enzime în dependenţă de pH***

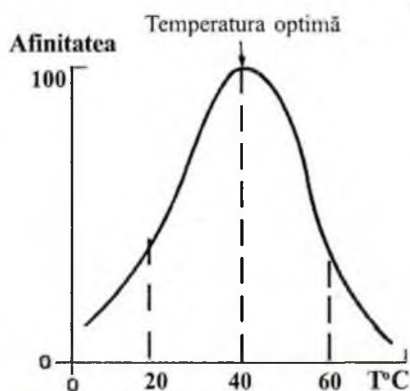


Figura 1.22. ***Efectul temperaturii asupra activităţii enzimelor***

EXPRIMAREA ACTIVITĂȚII ENZIMATICE

Pentru a exprima activitatea enzimei sunt necesari următorii factori: ecuația sumară a reacției; metoda de analiză; cofactorii enzimei, ionii sau coenzimele ei; valoarea constantă după Michaelis; pH și T⁰C optime.

În practica biochimică curentă sunt importante variațiile de activitate, și nu activitatea absolută. Se ia o anumită unitate arbitrară, care servește drept referință.

- *Unitatea Internațională (U.I.)* e acea activitate enzimatică ce asigură conversia a 1 μmol de substrat într-un minut în condiții standardizate de pH, T⁰C (25-30). Cofactorii și alte condiții optime asigură acțiunea enzimelor.

- *Katalul (kat)* constituie activitatea care asigură transformarea unui mol de substrat într-o secundă (1mkat = 60 U.I),(1 U.I. = 16,67 nkat).

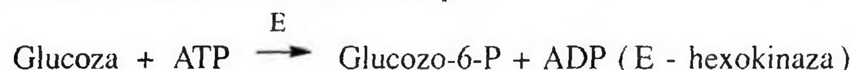
Se mai utilizează:

- *activitatea specifică* — numărul de U.I. cu referință la 1mg proteină;

- activitatea moleculară - numărul de molecule de substrat transformate de către o moleculă de enzimă într-o secundă — *numărul turnover* (carbanhidraza - 36 milioane pe minut, catalaza - 40.000.000/sec.);

- activitatea oxidoreductazelor cu coenzima NAD^+ sau $NADP^+$ se exprimă prin *creșterea sau descreșterea extincției la 340 nm* (absorb numai formele reduse). Ca unitate servește creșterea sau scăderea cu 0,001 a extincției într-un minut.

La reacțiile fermentative ale metabolismului iau parte enzimele care se leagă cu moleculele diferitelor substraturi. Exemplu:



$$\text{Glucoza} + \text{ATP} \xrightarrow{E} \text{Glucozo-6-P} + \text{ADP} \ (\text{E - hexokinaza})$$

Reacțiile cu participarea a 2 și mai multe substraturi includ transferul atomilor sau grupelor funcționale de la un substrat la altul. Atare reacții decurg în două moduri.

Primul tip de reacții — *reacții de substituție unitară:* 2 substraturi A și B se leagă specific sau sporadic cu enzima, rezultînd formarea complexului EAB cu scindarea lui în C și D (fig.1.23); al doilea tip de reacții — reacții ce decurg conform *mecanismului substituției duble* (de tipul «ping-pong»). În astfel de reacții CA al enzimei în fiece moment leagă un substrat.

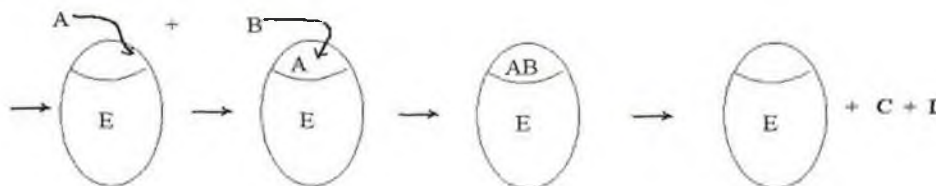


Figura 1.23. ***Reacții de substituție unitară***

Adiționarea primului substrat e însoțită de transferul grupei funcționale pe enzimă și numai după eliminarea produsului format din primul substrat poate să adiționeze la enzimă și al doilea substrat, după care să recepționeze grupa funcțională:



$$AX + B \longrightarrow A + BX \text{ (fig.1.24).}$$

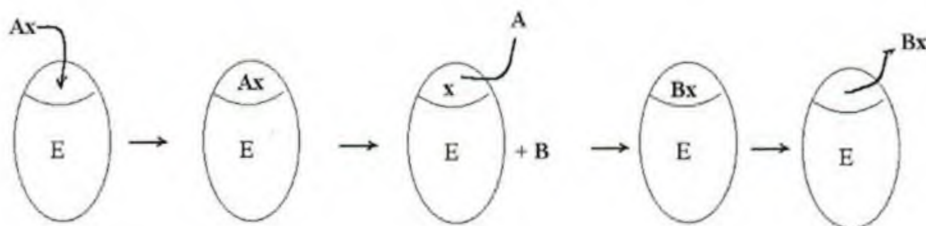


Figura 1.24. ***Reacții de substituție dublă***

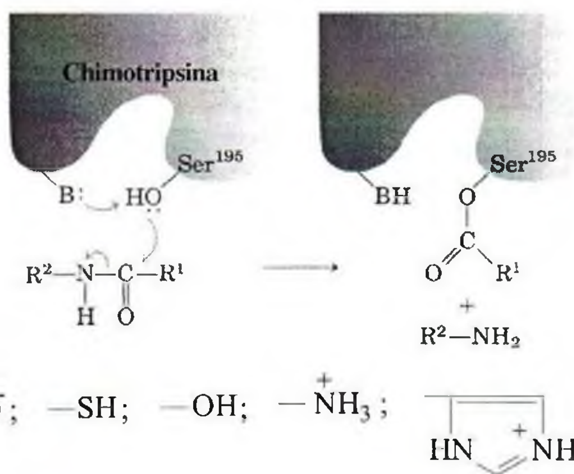
Am accentuat că enzima accelerează viteza reacțiilor catalizate de 10^8 - 10^{20} ori. Ureaza la pH = 8 și T = 20 ^{0}C mărește viteza reacției de 10^{14} ori.

Care este mecanismul ce atribuie enzimelor o activitate intensă în condiții atît de subtile?

Sunt antrenați 4 factori decisivi:

1. Apropierea și orientarea substratului de grupa catalitică. Legătura chimică explorată a substratului se află nu numai foarte aproape, dar și direct orientată față de grupele catalitice. În consecință, probabilitatea că complexul ES va atinge starea de tranziție se amplifică.

2. Tensionarea și deformarea sunt într-o concordanță indusă: alipirea substratului produce modificări conformaționale în molecula enzimei, tensionînd structura CA, concomitent deformîndu-se și substratul legat, ceea ce favorizează atingerea stării de tranziție a complexului ES. Apare concordanța indusă, adică modificări în structura terțiară și cuaternară a moleculei enzimatice.



3. Cataliza generală acido-bazică. În CA al enzimei conlucrează grupe specifice ale resturilor de aminoacizi, servind drept donatori sau acceptori de protoni. Grupele acide și bazice reprezintă catalizatori efectivi ai multor substanțe organice din soluțiile apoase (fig.1.25).

$-COO^-$; $-SH$; $-OH$; $-\overset{+}{N}H_3$; HN NH (imidazoliu, +)

4.Cataliza covalentă. Enzimele reacționeaza cu substraturile, formînd compuși ES nestabili legați covalent, care în reacțiile ulterioare formează produsul reacției mult mai rapid decît în reacțiile necatalizate. Compusul covalent e nestabil și se hidrolizează mult mai rapid decît R.



$$RX + E-OH \longrightarrow R-OH + EX \Longrightarrow EX + HOH \longrightarrow E-OH + HX$$

Enzimele stimulează diferite procese metabolice în celule, fiind organizate *în sisteme (sau complexe) multienzimatice,* în care enzimele activează coordonat. Ele generează reacții succesive ale unei anumite căi metabolice. Produsul primei reacții din astfel de sisteme devine substrat pentru cealaltă enzimă.

Sistemele multienzimatice pot include 15 şi mai multe enzime, care activează într-o anumită succesiune. În fiecare sistem există un ferment cu rol de dirijor, care determină viteza tuturor reacțiilor catalitice din lanț, fiindcă catalizează stadiul-limită, adică reacția cea mai lentă, ce determină viteza procesului în întregime. Enzimele de acest tip îndeplinesc nu numai funcția catalitică, dar şi cea de modificator al propriei activități (↓↑), ca respondente la diferite semnale. Ca rezultat, fiecare reacție metabolică îşi schimbă viteza, fapt ce conduce la adaptări rapide. În condițiile noi apare *o adaptare imediată*, de avarie. În această categorie logic se include transformarea enzimei neactive în activă, sub influența factorilor atît specifici, cît şi nespecifici.

În majoritatea sistemelor multienzimatice *fermentul-dirijor* catalizează prima reacție din lanțul lor consecutiv. Cantitatea suficientă de ceilalți fermenți determină activitatea catalitică intensivă, îndeplinind indicațiile dirijorului şi intensificîndu-şi activitatea la creşterea cantității de substrat.

*Enzimele, activitatea cărora se găseşte sub influența unor semnale moleculare, sunt numite **enzime reglatoare**.* Există 2 clase de astfel de enzime: una — *alosteric reglate* (*Allo stereos* - alt loc) *de modulatori* ce se fixează necovalent, şi a doua — enzime ce se reglează *prin modificări covalente.*

ENZIMELE ALOSTERICE. Ele posedă cu totul alt sau alte centre decît cel activ, în care sunt fixați liganzii. Ce le este caracteristic acestor enzime?

1. Posedă, ca şi toate enzimele, centru catalitic, unde se fixează şi se modifică substratul, dar mai posedă un alt centru care are o pozitie spațială pentru fixarea metabolitului reglator, numit efector sau modulator. Acest centru e specific pentru fiecare modulator.

2. Moleculele enzimelor alosterice sunt mai mari, mai complexe şi primordial oligomere pare.

3. Au cinetica lor — viteza reacțiilor, în dependență de concentrația substratului, are forma sigmoidală, dar nu hiperbolică, cauzată de urmările interacțiunii între protomeri ce leagă substratul în mod cooperativ (exemplu — mioglobina şi hemoglobina — fig.1.26).

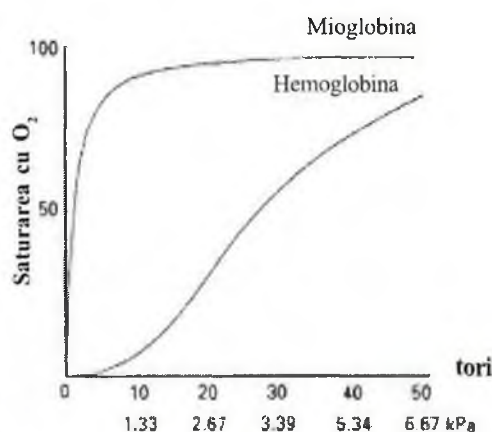


Figura 1.26. ***Curbele de oxigenare ale mioglobinei (Mb) şi hemoglobinei (Hb)***

Există 2 tipuri de enzime alosterice:

a) *homotrope* în care modulatorul şi substratul constituie aceeaşi substanță. Acumularea substratului activează viteza reacției catalizate de această enzimă:

$$\text{Glucoza} + \text{ATP} \xrightarrow{\text{Hexokinaza}} \text{G}-6-\text{P}+\text{ADP}$$

(de altfel, ca şi alcoolul ce activează enzima ce îl scindează - alcooldehidrogenaza);

b) *heterotrope* — enzimele sunt reglate de modulatori care diferă după structură de substrat, mulţi dintre ei avînd acţiune antipodă. La fixarea modulatorului, enzimele alosterice îşi modifică conformaţia. Modulatorii accelerează sau inhibă utilizarea substratului de enzima respectivă (fig.1.27).

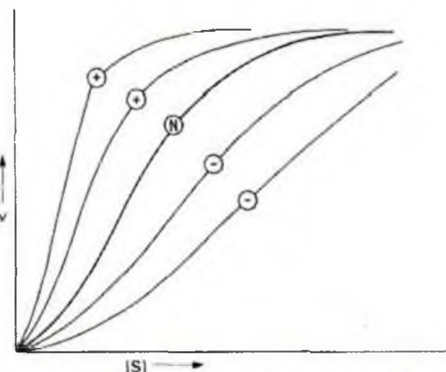


Figura 1.27. ***Influenţa modulatorilor pozitivi (+) şi negativi (-) asupra cineticii reacţiilor catalizate de enzimele alosterice***

Unele sisteme enzimatice manifestă o particularitate deosebită: produsul final al sistemului inactiveaza enzima — un rezultat al activităţii mai productive a sistemelor multienzimatice, decît e necesar celulei. Acest produs final acţionează ca un inhibitor specific al primei enzime şi, ca rezultat, viteza sistemului se echilibrează în corespundere cu cerinţele celulei - *retroinhibiţie* sau inhibiţie prin produs final, inhibiţie de tip *feed back*. Transformările L-treonina ⟶ L-izoleucina necesită 5 enzime. Prima enzimă e treonindehidrataza, inactivată de izoleucină, modulator ce se fixează în CA. Este un exemplu clasic de *reglare necovalentă* şi e reprodus în fig.1.28.

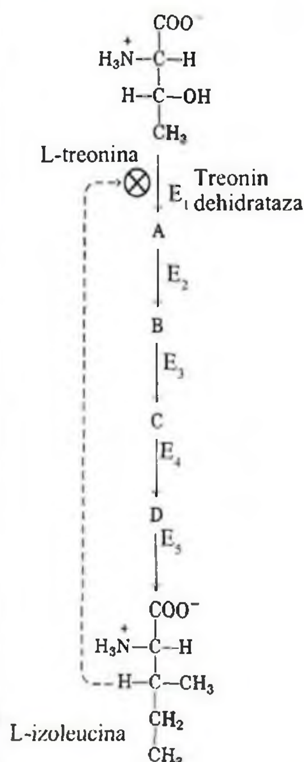


Figura 1.28. ***Inhibiţia de tipul feed back. Conversia L-treoninei în L-izoleucină catalizată de o succesiune de enzime. Treonindehidrataza E_1 este inhibată de produsul final***

Se înregistrează *enzime reglatoare*, la baza activării cărora se atestă modificări covalente ale moleculei:



$$\text{Glicogen}_n + \text{P} \xrightarrow{E} \text{Glicogen}_{n-1} + \text{Glucozo-1-P}$$

Enzima *fosforilaza A* (forma activă constituie un dimer compus din 2 protomeri identici, fiecare avînd rest specific de serină, fosforilat pe grupa OH) catalizează reacţia. *Fosfataza* fosforilazei catalizează hidroliza legăturii P cu serina şi transferă F «A» în F «B» mai puţin activă. *Kinaza* fosforilazei catalizează transferul grupei P de la ATP la OH serinei şi reactivează activitatea enzimei ("B" ⟶ "A") (fig.1.29).

Trecerea dintr-o formă în alta e însoţită de modificari ale structurii cuatemare ce atinge centrul activ, reglează activitatea enzimei. Asocierea protomerilor "B" activează "A".

Reacţiile catalizate de enzimele alosterice sunt ireversibile, au ΔG - negativă. Există şi alte modificări covalente ale enzimelor — metilarea resturilor de aminoacizi, adiţionarea adenilatului etc. (fig.1.30).

La unele enzime foarte complexe activitatea poate fi reglată atît covalent, cît şi necovalent.

O categorie de enzime sunt sintetizate în forma neactivă de precursor, care se activează la o *proteoliză limitată* (proenzimele). Exemplu:

1) enzimele digestiei ce scindează proteinele în stomac şi duoden - pepsinogenul, chimotripsinogenul, tripsinogenul, proelastaza, procarboxi peptidaza;

2) coagularea sîngelui e determinată de avalanşa de reacţii cu acţiune proteolitică;

3) hormonii proteici (insulina);

4) proteinele fibrilare (colagenul).

Există o grupă de proteine-enzime, starea activă a cărora e condiţionată de împachetarea spontană a moleculelor cu formarea unei structuri tridimensionale caracteristice enzimei date (lizozim).

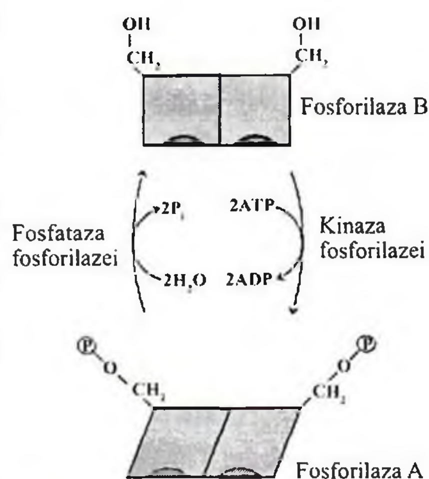


Figura 1.29. ***Reglarea activităţii glicogen fosforilazei prin modificările covalente***

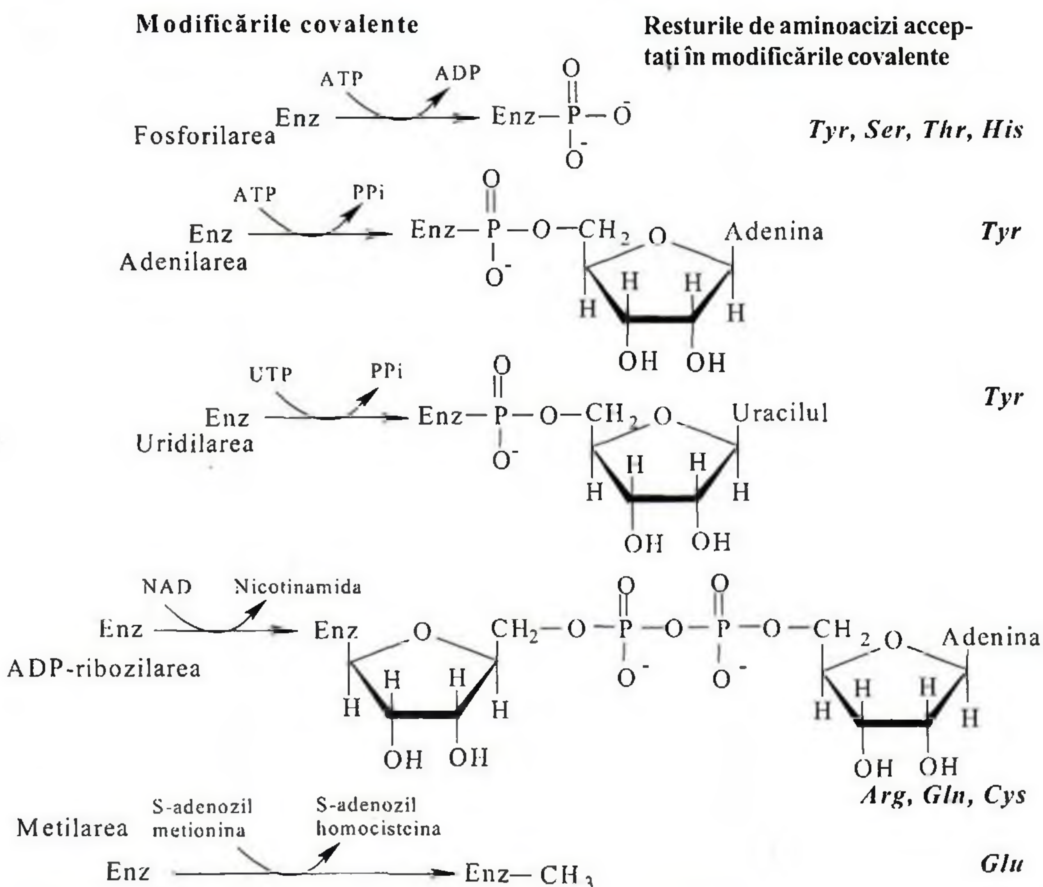


Figura 1.30. ***Exemple de modificări covalente ale diferitelor enzime***

În 1922 Al. Fleming descoperă, într-un mod deosebit, lizozimul, iar în 1929 tot dînsul descoperă şi penicilina.

Mecanismul interacţiunii alosterice

În 1965 savanţii J. Monod, J. Wyman, J. Changeux au propus un model fin şi clar al interacţiunilor alosterice (MWC) — *modelul simetric* sau *"concentrat"*, avînd următoarele caracteristici cardinale (fig.1.31):

1. enzima alosterică este compusă din 2 subunităţi identice, simetrice, cu un centru activ, centrele fiind echivalente;

2. enzima (oligomerul) poate exista în două stări: T-tensionată (constrînsă), cu afinitate mică de substrat, şi R-relaxată, cu o afinitate mare de substrat;

3. conformaţia fiecărui monomer este constrînsă de asocierea cu ceilalţi monomeri;

4. formele T şi R pot trece din una în alta şi se află în echilibru T $\rightleftharpoons$ R;

5. pentru acest model se face o excepţie: întru a păstra simetria dimerului, ambele subunităţi trebuie să adere la aceeaşi conformaţie.



Figura 1.31. ***Modelul simetric de fixare cooperativă a substratului***

În lipsa substratului, toate moleculele se află în forma T (la 10^4 molecule — o moleculă poate căpăta forma R).

Prezenţa substratului modifică conformaţia, ducînd la apariţia formei R. Cînd substratul se leagă cu centrul activ, celălalt la fel trebuie să se afle în R - stare. Trecerea de la T la R şi viceversa se produce coordonat. La adiţionarea substratului partea moleculară a enzimei în starea R progresează şi fixarea substratului devine cooperativă. La o saturaţie completă toate moleculele enzimei se fixează în R stare.

Inhibitorul se leagă cu forma T, activatorul — cu forma R, astfel efectele homotrope devin pozitive, iar cele heterotrope — pozitive sau negative (fig.1.32).

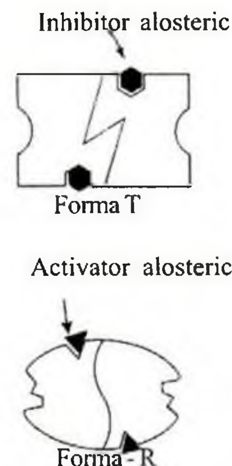


Figura 1.32. ***Inhibitorul alosteric stabilizează forma T, pe cînd activatorul respectiv — forma R***

D.Koshland, G.Nemethy şi D.Filmer (KNF) propun *modelul secvenţial*, mai clasic (fig.1.33). Baza lui constituie trei postulate:

1. fiecare monomer poate exista în una din conformaţiile posibile - T sau R;

2. fixarea substratului modifică forma doar a unei subunităţi, cealaltă nu suferă modificări vădite;

3. modificările conformaţionale determinate de substrat la o subunitate pot mări sau micşora afinitatea la substrat a celorlalte subunităţi. Fixarea este cooperativă.

Deosebirile între modele: cel simetric nu presupune echilibru între formele R şi T în lipsa substratului, dar din contra, fixarea substratului induce trecerea T $\rightarrow$ R.

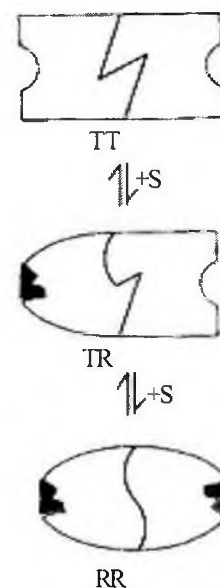


Figura 1.33. ***Modelul secvențial de fixare cooperativă a substratului***

În acest model esențială este simetria monomerilor.

Modelul secvențial denotă că trecerea de la T la R în diferite subunități are loc coordonat și într-o anumită succesiune. Un rol primordial are forma hibrid RT. Monomerii interacționează cu condiția prezenței formei conformaționale diferite. În ultimul model (secvențial) efectul substanțelor homotrope poate fi pozitiv și negativ. Fixarea de enzimă a două molecule de substrat depinde efectiv de natura modificărilor structurale, determinate de fixarea primei molecule de substrat.

Recent se consideră că aceste modele reprezintă două cazuri aparte de interacțiune. În realitate ea e mult mai complexă, dependentă de particularitățile structurii cuaternare, terțiare etc.

E stabilit că sub acțiunea guanidinhidroclorurei (G_4HCl) sau a ureei inactivația unor enzime are loc la concentrații relativ mici ale agenților denaturanți, în care nu se observă modificări globale în conformația moleculei. Studiile recente confirmă că pierderea activității fermentative e determinată de micșorarea interacțiunii în molecule ce are, drept consecință, creșterea mobilității părții ei lăuntrice. Și denaturarea termică prezintă date că pentru un șir de enzime inactivarea este antecedentă modificărilor conformației, care este indusă de T înaltă. Pierderea activității enzimatice în acest caz nu e provocată de *efectul inhibitorilor*. Posibil că enzimele oligomere (*creatin kinaza*), disociind la monomeri, ar putea să se inactiveze în lipsa vădită a desfășurării moleculei enzimatice. Observațiile denotă că disocierea creatin kinazei are loc la concentrații ale agentului denaturant, cu mult mai majore decît ale celor ce provoacă inactivarea enzimei.

Studiile actuale demonstrează că micșorarea activității enzimatice în condiții de concentrații relativ mici ale agenților denaturanți sunt cauzate nu de efectul lor inhibitor sau de disociația enzimelor oligomere, dar de dependența de *perturbarea conformației centrului activ.*

Datele experimentale elucidează că centrele active ale majorității enzimelor sunt situate în regiuni ale moleculei mult mai mobile (între domenii) și deci sunt mult mai sensibile la acțiunea agenților denaturanți sau a factorilor fizici. În conformitate cu ipoteza "*potrivirii induse*" a lui D.Koshland, în fiecare fază a ciclului catalitic regiunea centrului activ capătă o conformație specifică fazei. Activarea enzimei este rezultatul coaptării CA a conformației, perfecte, ce determină efectul catalitic maxim. Dar în caz de sporire a activității enzimatice la încălzire și proteoliză, are loc trecerea dintr-o conformație compactă și stabilă în alta relativ mai deschisă și structurată mai fin. La proteoliză limitată activarea zimogenului e cauzată nu de coaptarea CA a conformației perfecte cu modificări fine în trecerea de la conformația zimogenului la cea necesară pentru cataliză, dar de majorarea mobilității moleculei proteice în regiunea CA. Anume *flexibilitatea*, dar nu structura bine formată a centrului activ, e responsabilă pentru funcția catalitică.

INHIBIŢIA ACTIVITĂŢII ENZIMELOR

Activitatea enzimatică poate fi inhibată de molecule mici specifice, precum şi de ioni, în ansamblu prezentînd un mecanism de control. Distingem *inhibiţie specifică şi nespecifică*. Inhibiţia stă la baza acţiunii substanţelor medicamentoase, a agenţilor toxici şi poate fi *reversibilă şi ireversibilă*.

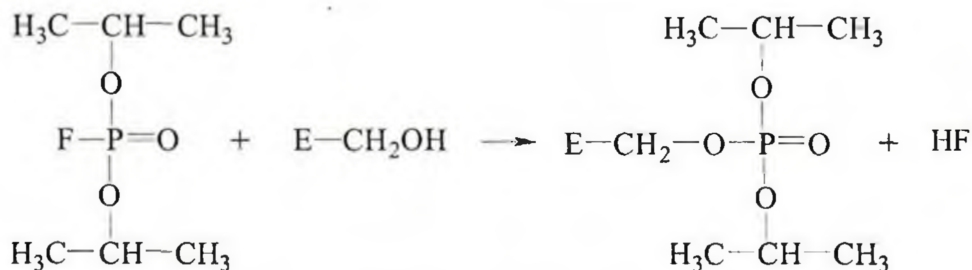
La **inhibiţia ireversibilă** inhibitorul se fixează sau se leagă covalent atît de profund de enzimă, încît disocierea are loc foarte lent. În acest tip de inhibiţie se formează un complex enzimă-inhibitor stabil, nedisociabil: E + I $\longrightarrow$ EI (reacţie ireversibilă).

Inhibiţia ireversibilă prezintă următoarele caracteristici:

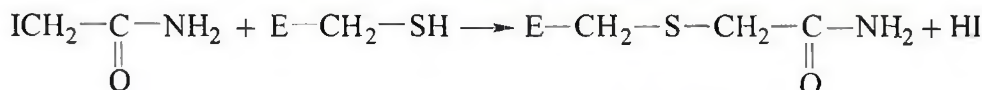
1. Inhibiţia se accentuează progresiv, pînă la înlăturarea completă a activităţii enzimatice şi nu poate fi anulată prin îndepărtarea inhibitorului.
2. Se datorează unor modificări covalente şi permanente ale grupărilor funcţionale necesare catalizei, transformînd enzimele în molecule inactive.
3. La început, acest tip de inhibiţie este incompletă, dar creşte pe durata timpului, pe măsură ce apar modificările chimice respective.

Aproape toţi inhibitorii ireversibili sunt substanţe toxice, fiind numite şi «otrăvuri enzimatice». Amintim în acest sens acidul iodacetic, DIPFP, metalele grele, compuşii arsenici, etc. Aceştia interacţionează cu radicalii aminoacizilor din centrul activ al enzimei, esenţiali pentru structura şi funcţia acestuia.

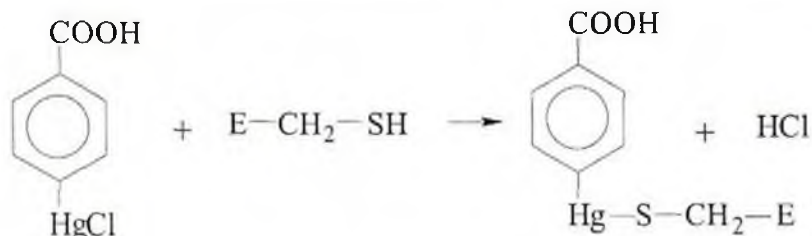
Exemple: *Diizopropilfluor fosfatul* (toxina neuroparalitică) se fixează de grupa OH a serinei în CA al acetil colinesterazei cu formarea enzimei neactive:



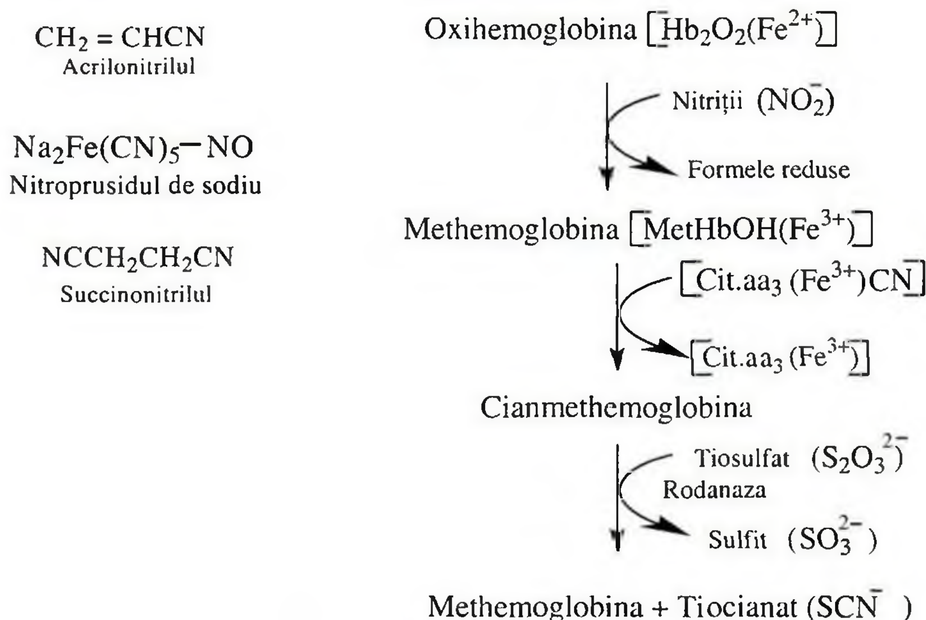
Iodacetamida se fixează de cisteina din centrul activ al enzimelor:



Paraclormercur benzoatul de asemena leagă grupele SH din centrul activ:



Ca surse nedietare de cianide poate fi *nitroprusidul de sodiu* (agent hipotensiv), *succinonitrilul* (agent antidepresant), *acrilonitrilul*, cît şi fumul de ţigară. Expoziţia cronică se manifestă prin demielinizare, leziuni ale nervului optic, ataxia şi depresia funcţiei glandei tirode. Intoxicaţia acută cu cianide necesită un tratament rapid. Baza biochimică a tratamentului efectiv constă în crearea unui complex nontoxic al fiero-porfirinei. Administrînd nitriţii ($NaNO_2$ - intravenos, amilnitrita - inhalaţie) convertim porţiunea de hemoglobină normală în methemoglobină (Fe^{3+}). Ultima e capabilă să fixeză complexul CN-citocromoxidazic eliberînd citocromoxidaza şi generînd cianmethemoglobina. Methemoglobina este reîntoarsă în proces graţie activităţii *rodanazei* (tiosulfat-cianid sulftransferaza) eritrocitare, care va transforma tiosulfatul în tiocianat.



La o **inhibiţie reversibilă** echilibrul dintre enzime şi inhibitori se instalează repede. Inhibiţia revesibilă prezintă următoarele caracteristici:

1. Între enzimă şi inhibitor se formează un complex EI, $E + I \rightleftharpoons EI$ (reacţie reversibilă). Reacţia fiind reversibilă, inhibiţia poate fi înlăturată prin deplasarea echilibrului spre stînga, cu regenerarea enzimei.

2. Se poate defini şi o constantă de disociere a inhibiţiei complexului EI:



$$K_i = \frac{[E][I]}{[EI]}$$

3. Inhibiţia reversibilă poate fi competitivă, uncompetitivă şi necompetitivă.

La ***inhibiţia competitivă*** inhibitorul se fixează de centrul activ al enzimei, ca urmare a afinităţii structurii cu substratul, concurînd cu el şi împiedicînd fixarea lui.

Nu e posibilă fixarea simultană a substratului şi inhibitorului. Enzima va fixa acel competitor care se acumulează într-o concentraţie mai mare. Inhibiţia competitivă diminuează viteza catalizei, micşorînd cota moleculelor de enzima fixatoare ale substratului.

Se poate prevedea efectul unor inhibitori pentru o enzimă dată, utilizînd ecuaţia Lineweaver-Burk - o formă invers reciprocă a ecuaţiei Michaelis-Menten. Grafic este reprezentată în fig.1.34.

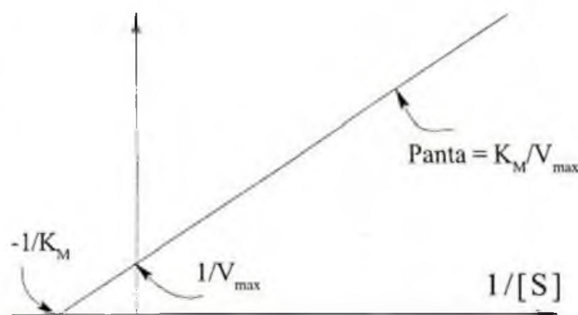


Figura 1.34. ***Reprezentarea grafică a ecuaţiei Lineweaver-Burk***

$1/V_o = 1/V_{max} \times K_M/[S] + 1/V_{max}$

În cazul inhibiţiei competitive: $\frac{1}{V} = \frac{K_M}{V_{max}} \cdot \frac{1}{[S]} (1 + \frac{[I]}{K_i}) + \frac{1}{V_{max}}$

Analizînd această ecuaţie se constată că dacă concentraţia S creşte foarte mult, 1/[S] tinde spre zero, iar ecuaţia devine: $\frac{1}{V} = \frac{1}{V_{max}}$

În inhibiţia competitivă, unde are loc interacţiunea de tipul $E + I \rightleftharpoons EI$, K_M creşte, V_{max} rămîne nemodificată, panta curbei L - B variază la intersepta constantă (fig.1.35 a şi b).

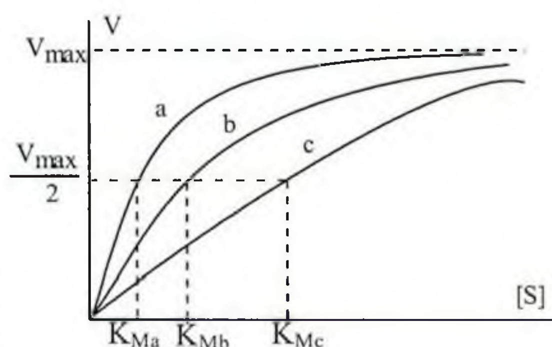


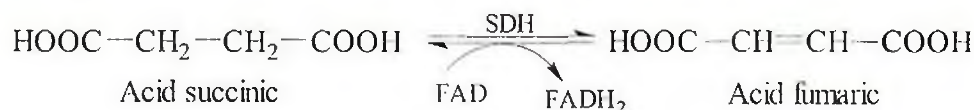
Figura 1.35a. ***Curba Michaelis-Menten în absenţa şi prezenţa inhibitorilor competitivi.***
a) fără inhibitor; b) cu cantităţi mici de inhibitor; c) cu cantităţi mari de inhibitor

Prin urmare, în cazul inhibiţiei competitive viteza de reacţie poate atinge Vmax, ca şi cum inhibitorul nu ar fi prezent, dacă se măreşte suficient de mult concentraţia substratului.

Inhibitorii competitivi însă măresc considerabil panta curbei K_M, scăzînd afinitatea enzimei pentru substrat.

Se observă că adăugarea inhibitorului nu modifică Vmax, deci atingîndu-se viteza maximă. În acelaşi timp creşte mult K_M, scăzînd afinitatea enzimei pentru substrat.

Exemplu:



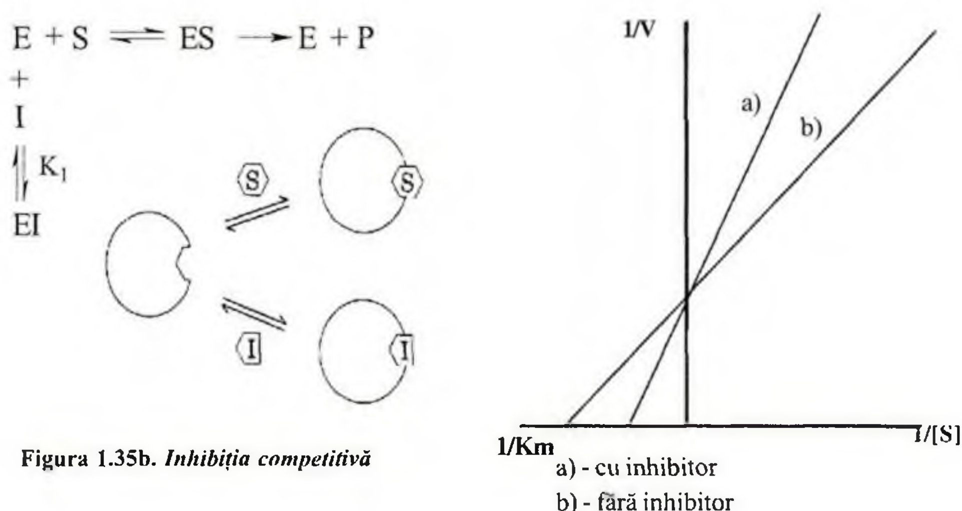
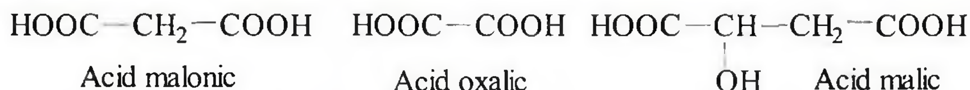
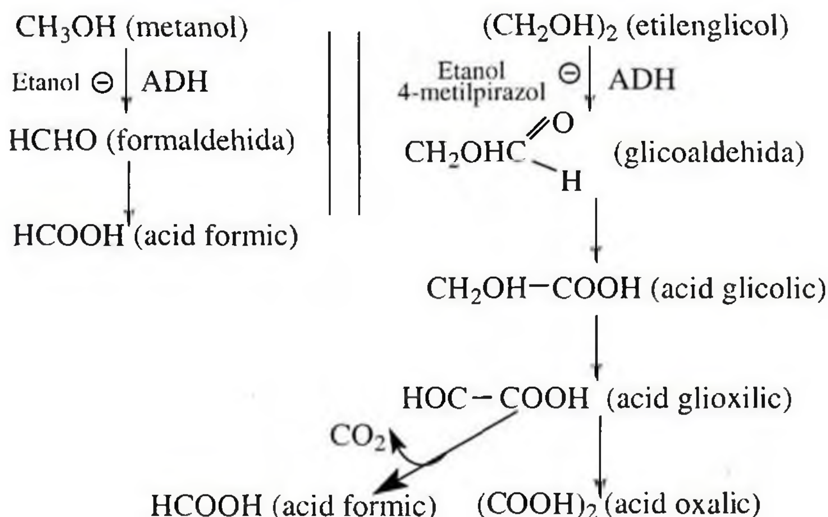


Figura 1.35b. *Inhibiția competitivă*

O structură similară o au acizii malonic, oxalic, malic, care pot servi drept inhibitori competitivi ai SDH.



Inhibitorul nu se scindează fermentativ. O particularitate esențială constă în faptul că efectul se înlătură la creșterea concentrației de substrat (succinat). Acest principiu stă la baza tratamentului intoxicațiilor cu *etilenglicol* $(CH_2OH)_2$, component al antigelului. Produsul oxidării, $(COOH)_2$, este toxic și apare ca rezultat al acțiunii alcool dehidrogenazei (ADH). Cristalele de oxalați ușor se precipită, dereglînd funcțiile rinichilor. Administrarea *etanolului* în doze aproape toxice inhibă reacția de oxidare și *etilenglicolul* se elimină din organism fără consecințe grave.



Acelaşi mecanism stă la baza tratării intoxicărilor cu *metanol*. Produsul oxidării este *acidul formic* (HCOOH). Foarte sensibile la intoxicații cu metanol sunt celulele retinei ochiului, sistemului nervos central (depresie). O terapie întîrziată include hemodializa şi administrarea bicarbonaților exogeni.

O categorie importantă de inhibitori competitivi sunt *sulfamidele* şi derivații respectivi. Acțiunea antibacteriană a sulfamidelor constă în substituirea *acidului p-aminobenzoic* (PAB) din *acidul folic*, indispensabil pentru creşterea microorganismelor, împiedicînd dezvoltarea lor. Metabolismul în organismul gazdei nu este afectat deoarece acidul folic este asigurat de aport alimentar. Eficacitatea sulfamidelor e dependentă de cantitățile administrate.

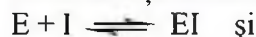
La o ***inhibiție necompetitivă***, dar reversibilă, inhibitorul şi substratul se leagă simultan cu enzima, dar locusurile sunt diferite. Acțiunea inhibitorului constă în micşorarea numărului turnover al enzimei, dar nu şi a numărului de molecule de substrat. Mărirea concentrației de substrat nu micşorează inhibiția.

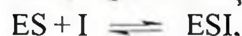
Inhibiția necompetitivă prezintă următoarele caracteristici:

1. Între inhibitor şi substrat nu se realizează o competiție pentru a se lega de enzimă.
2. Inhibitorul nu prezintă asemănări structurale cu substratul.
3. Inhibitorul se leagă de enzimă în alt loc decît centrul activ.
4. Inhibitorii necompetitivi scad V_{max}, dar nu afectează K_M.

Deoarece inhibitorii se leagă de enzimă în alt loc decît centrul activ, este posibilă formarea complexului ES, cît şi a complexului ESI. Deoarece complexul ESI nu se poate scinda pentru a forma produsul de reacție, la o viteză de formare a complexului ES mai mare decît a complexului ESI, reacția este încetinită, dar nu oprită.

La o inhibiție necompetitivă (noncompetitivă) de tipul


$E + I \rightleftharpoons EI$ şi


$ES + I \rightleftharpoons ESI$,

K_M nu se modifică, V_{max} descreşte, iar panta şi intersepta variază (fig.1.36a şi b).

Se observă că $1/V_{max}$ creşte, deci în inhibiția necompetitivă V_{max} scade.

Practic, în cazul inhibiției necompetitive inhibitorul, chiar dacă nu se leagă de centrul activ al enzimei, acționează asupra acesteia deformînd-o, astfel încît ea nu mai poate forma complexul ES la viteză normală pe de o parte, iar pe de altă parte complexul ES format nu se mai descompune cu viteză normală pentru a forma produsul de reacție. Este evident că în acest caz inhibiția nu poate fi înlăturată prin mărirea concentrației substratului.

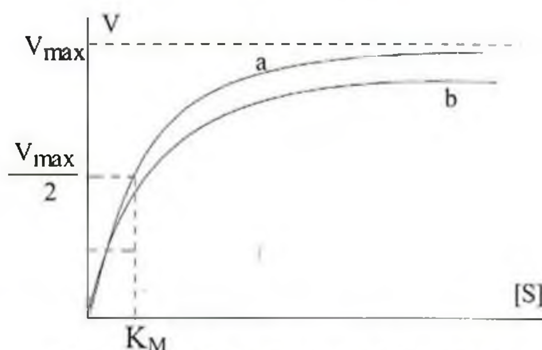
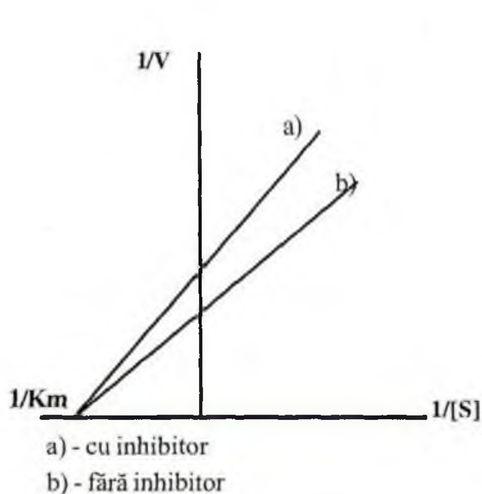


Figura 1.36a. ***Curba Michaelis-Menten în absența şi prezența inhibitorilor necompetitivi.***
a) fără inhibitor; b) cu inhibitor necompetitiv



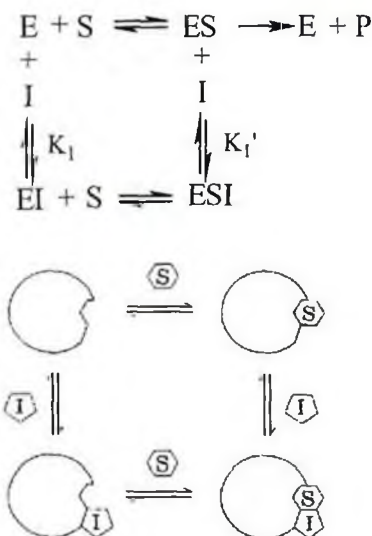


Figura 1.36b. *Inhibiția noncompetitivă*

Cei mai vădiți inhibitori de acest tip în celulele vii sunt produsele intermediare ale metabolismului, care se fixează reversibil cu locusurile specifice pe suprafața unor enzime reglatoare, modificînd activitatea lor.

Iată cîteva exemple:

1. Cel mai comun tip de inhibiție necompetitivă este produs de agenții chimici care se pot combina cu unele grupări funcționale ale enzimei; acestea, chiar dacă nu fac parte din centrul activ al enzimei, sunt esențiale pentru menținerea structurii tridimensionale și, prin urmare, pentru activitatea catalitică a acesteia.

Spre exemplu, ionii metalelor grele (Hg^{2+}, Ag^{+}, Pb^{2+}), unele substanțe organice ca acidul iodacetic, PCMB, DTNB etc. sunt inhibitori necompetitivi pentru numeroase enzime.

2. Unele enzime metaloactive sunt inhibate necompetitiv de agenți capabili să lege aceste metale, precum este EDTA care complexează ionii Mg^{2+}, Ca^{2+}, Mn^{2+}.

3. Inhibitori necompetitivi sunt și CN^{-} și CO pentru citocromi, substanțe care intervin în ultimul segment al lanțului respirator mitocondrial.

***Inhibiția uncompetitivă** (incompetitivă)* prezintă următoarele caracteristici:

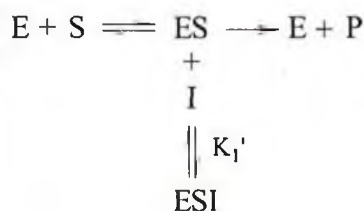
1. Inhibitorul nu se combină cu enzima liberă și nu afectează relația ei cu substratul.

2. Inhibitorul se combină cu complexul ES, formînd un complex ESI ce nu poate genera produsul dorit.

3. Se întîlnește rar în reacțiile cu un substrat, dar este frecventă în reacțiile cu două sau mai multe substraturi.

Deci, la o inhibiție incompetitivă panta este constantă, intersepta variază, K_M și V_{max} se micșorează (fig.1.37a și b).

Reprezentarea grafică a ecuației Lineweaver-Burk în diferite cazuri de inhibiție este redată în fig.1.38.



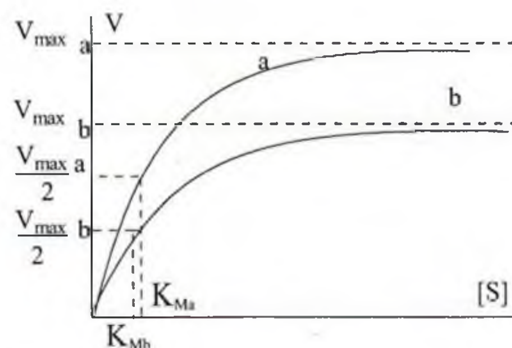


Figura 1.37a. *Curba Michaelis-Menten în absența și prezența inhibitorilor incompetitivi.*
a) fără inhibitor; b) cu inhibitor incompetitiv

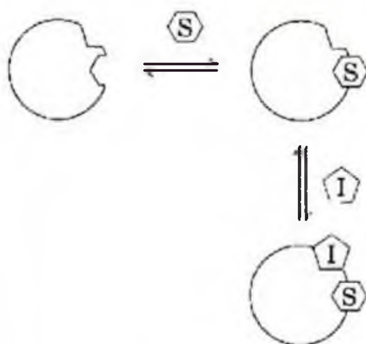
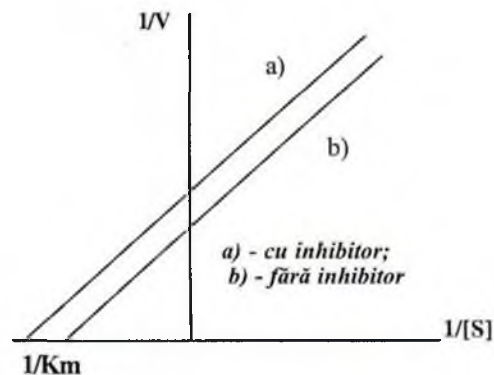


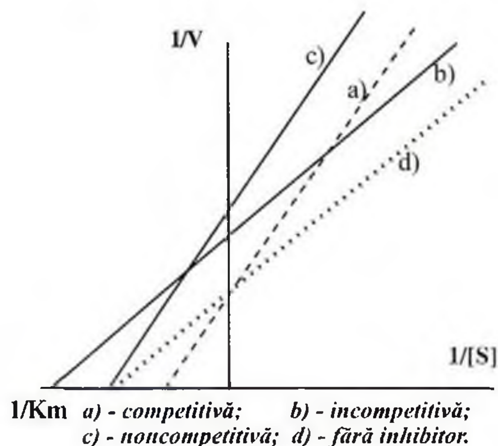
Figura 1.37b. *Inhibiția incompetitivă*



Activitatea enzimatică poate fi inhibată la interacțiunea diferitor subunități ale enzimelor oligomere - *inhibiția alosterică.*

Izoenzimele. Se atestă enzime ce există în *forme moleculare multiple,* la aceeași specie, în același țesut și chiar în aceeași celulă. Catalizează aceeași reacție, dar se deosebesc după proprietățile cinetice, după aminoacizi ca componentă și succesiune. Atare forme multiple se numesc ***izoenzime.***

E studiată mai detaliat LDH - lactat dehidrogenaza ce catalizează transformarea lactatului în piruvat. Fiecare izoenzimă e compusă din 4 lanțuri polipep-



a) - competitivă; b) - incompetitivă; c) - noncompetitivă; d) - fără inhibitor.

Figura 1.38. *Reprezentarea grafică a ecuației Lineweaver-Burk în diferite cazuri de inhibiție*

tidice cu masa moleculară aproximativ egală cu 33500 Da, care conțin două tipuri de lanțuri polipeptidice în diferite raporturi: A(M) şi B(H), codificate de gene diferite. Enzima ce conține H_4 se localizează în inimă - LDH_1, iar cea compusă din M_4 - în muşchi - LDH_5. Izoenzimele diferă atît după V_{max} şi K_M pentru substratul lor, cît şi după sensibilitatea la modulatori alosterici (fig. 1.39-1.40). E bine cunoscută şi creatin kinaza care are 3 izoenzime (M, B, MB) la asocierea a 2 lanțuri polipeptidice.

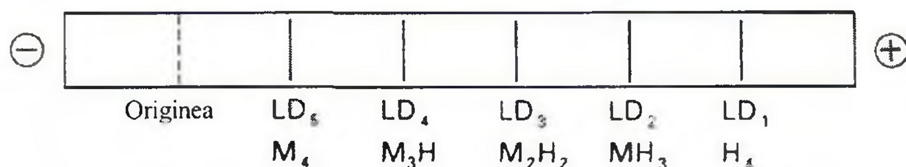


Figura 1.39. ***Repartizarea electroforetică a izoenzimelor lactat dehidrogenazei***



Figura 1.40. ***Subunităţile componente ale izoenzimei lactat dehidrogenazei***

Care-s factorii ce determină prezența izoenzimelor? Aceştia sunt:

1. Particularitățile metabolice ale diferitelor organe.

2. Localizarea si rolul metabolic al enzimei anumite în celulele aceleiaşi specii - (mitocondrii sau citozol-malat dehidrogenaza-MDH).

3. Procesul de evoluare şi diferențiere a țesutului omului matur din formele inițial-embrionare (LDH ficatului la embrion are o anumită caracteristică, ce se schimbă o dată cu evoluția organului; scindarea glucozei la tumori e catalizată de aceleaşi enzime, proprii şi embrionului).

4. Sensibilitatea la modulatorii alosterici care permit o reglare fină a reacțiilor metabolice.

5. Rezultatul mutațiilor ce modifică activitatea catalitică a enzimelor şi cauzează maladii genetice, dar nu întotdeauna. Se pot observa şi fenomene opuse - adaptarea la factorii nocivi.

Enzimele din celule se pot afla şi în stare liberă (în citozol), se pot fixa de structuri supramoleculare (în matricea mitocondrială); se organizează în complexe multienzimatice sau asociate, îndeosebi cele ce conțin mai multe subunități (fosforilaza). Unor enzime le este caracteristică o localizare dublă: în citozol şi în mitocondrii (MDH).

Există enzime ataşate la membrane (membrana citoplasmică - adenilatciclaza); mitocondriile înzestrate cu două membrane se caracterizează printr-o distribuție complexă a enzimelor.

Complexele enzimatice sunt fixate de diferite structuri. P. Srere (1985) propune termenul *metabolon* care reprezintă un complex enzimatic supramolecular ce catalizează consecutiv fazele unei căi metabolice şi elementele structurale ale celulei. Adică noțiunea include şi

substructura celulară în care este absorbit complexul. Exemplu: enzimele glicolitice cu proteina respectivă în membrana eritrocitului; complexul PDH cu elementele structurale ale membranei interne mitocondriale; sintetaza acizilor graşi etc. Dimensiunile metabolonilor oscilează vădit (2-5 mln kDa) cu diametrul particulelor 20-50 nm. Enzimele ciclului Krebs la fel reprezintă o organizare de enzime de tipul metabolonului. Este evident că enzimele în celule agreghează în complexe şi structuri bine determinate. Interacţionează cu formarea asocierilor de grad înalt, asigurînd integritatea celulei.

CLASIFICAREA ENZIMELOR

Principiul cardinal ce stă la baza clasificării şi denumirii enzimelor e determinat de tipul reacţiei catalizate şi mecanismul ei. Criteriile acestei sistematizări constau în următoarele:

1. Reacţiile şi enzimele respective sunt aranjate în şase clase, în fiecare clasă se diferenţiază cîteva subclase (de la 4 la 13).
2. Denumirea enzimei e compusă din două părţi: prima - de numirea substratului (sau a substraturilor), a doua — tipul reacţiei catalizate şi se finalizează cu *-aza.*
3. Fiecare ferment are codul său după clasificarea dată: prima cifră reprezintă clasa de reacţii, a doua — subclasa, şi a treia — subsubclasa (acceptorul), ultima cifră indică numărul de ordine.

Enzimele, în afară de denumirea lor sistemică, mai posedă şi o denumire trivială. Mai jos sunt redate cele 6 clase de enzime şi unele exemple.

1. Oxidoreductazele

Enzimele date catalizează reacţiile de oxidoreducere, transferul electronilor cu participarea a două substraturi: $S_r + S_o' \rightleftharpoons S_o + S_r'$. Sunt catalizate reacţiile cu participarea grupelor: CH-OH (1), C-OH, C=O (2), CH-CH (3), $CH\text{-}NH_2$ (4) şi CH-NH- (5).

Unele exemple de subclase:

1.1. Enzimele ce acţionează asupra grupei CH-OH ca donatoare.

1.1.1.1. Alcool: NAD^+ - oxidoreductaza (alcool dehidrogenaza)


Alcool + $NAD^+ \rightleftharpoons$ Aldehidă sau Cetonă + NADH + H^+

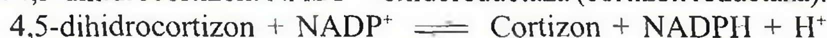
1.2. Enzimele ce acţionează asupra grupelor C-OH sau C=O ca donatoare.

1.2.1.12. D-gliceraldehid-3-fosfat: NAD^+ - oxidoreductaza (gliceraldehid-fosfat dehidrogenaza)


D-GA-3-P + P_i + $NAD^+ \rightleftharpoons$ D-1,3-difosfoglicerat + NADH + H^+

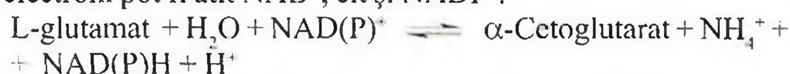
1.3. Enzimele ce acţionează asupra grupei CH-CH ca donatoare.

1.3.1.3. 4,5-dihidrocortizon: $NADP^+$ - oxidoreductaza (cortizon reductaza).


4,5-dihidrocortizon + $NADP^+ \rightleftharpoons$ Cortizon + NADPH + H^+

1.4. Enzimele ce acţionează asupra grupei $CH\text{-}NH_2$ ca donatoare.

1.4.1.3. L-glutamat: $NAD(P)^+$ - oxidoreductaza (dezaminaza). Denumirea trivială - glutamat dehidrogenaza. Forma $NAD(P)^+$ confirmă că acceptori de electroni pot fi atît NAD^+, cît şi $NADP^+$.


L-glutamat + H_2O + $NAD(P)^+ \rightleftharpoons$ α-Cetoglutarat + NH_4^+ +
+ NAD(P)H + H^+

1.5. Enzimele ce acționează asupra grupei C-NH ca donatoare.

1.5.1.3. 5,6,7,8-tetrahidrofolat: $NAD(P)^{-}$ - oxidoreductaza (tetrahidrofolat dehidrogenaza).

$$5,6,7,8\text{-THF} + NAD(P)^{+} \rightleftharpoons 7,8\text{-DHF} + NAD(P)H + H^{+}$$

1.6. Enzimele ce acționează asupra grupelor NADH sau NADPH ca donatoare.

1.6.4.2. NAD(P)H: glutation-oxidoreductaza (glutation reductaza).

$$NAD(P)H + H^{+} + GSSG \rightleftharpoons NAD(P)^{+} + 2GSH$$

1.8. Enzimele ce acționează asupra grupelor ce conțin sulf ca donator.

1.8.4.1. Glutation: homocistin-oxidoreductaza (glutation-homocistin transhidrogenaza).

$$2GSH + \text{Homocistin} \rightleftharpoons GSSG + 2\text{Homocistein.}$$

1.11. Enzimele ce acționează asupra H_2O_2 ca acceptor.

1.11.1.6. H_2O_2: H_2O_2 - oxidoreductaza (catalaza).

$$H_2O_2 + H_2O_2 \rightleftharpoons O_2 + 2\,H_2O$$

1.11.1.7. Donator: H_2O_2 - oxidoreductaza (peroxidaza).

$$\text{Donator} + H_2O_2 \rightleftharpoons D_o + 2H_2O$$

1.99. Alte enzime ce utilizează O_2 ca oxidant - lipooxigenaza, homogentizat oxigenaza etc.

2. Transferazele sunt enzime ce catalizează transferul grupelor funcționale (G) (diferite de atomul de hidrogen) de la un substrat la altul: S-G + S' ⇌ S'-G + S.

Catalizează aceste enzime transferul grupelor: monocarbonice(1), cetonice sau aldehidice (2), acil (3), glicozil (4), azotice (6), ce conțin fosfor (7) și sulf (8). Unele exemple:

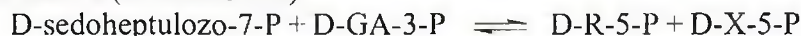
2.1. Transferul grupelor monocarbonice.

2.1.2.1. L-serina: tetrahidrofolat-10-oximetiltransferaza (serin-oximetil-transferaza).

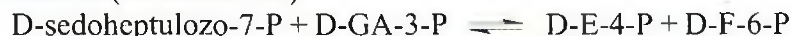

L-serina + THF ⇌ Glicina + 10-oximetil-THF

2.2. Transferul grupelor aldehidice și cetonice.

2.2.1.1. D-sedoheptulozo-7-fosfat: D-gliceraldehid-3-fosfat-glicolaldehid transferaza (transcetolaza).

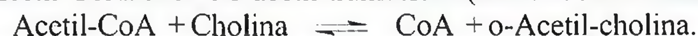

D-sedoheptulozo-7-P + D-GA-3-P ⇌ D-R-5-P + D-X-5-P

2.2.1.2. D-sedoheptulozo-7-fosfat: D-gliceraldehid-3-fosfat-dioxiaceton transferaza (transaldolaza).


D-sedoheptulozo-7-P + D-GA-3-P ⇌ D-E-4-P + D-F-6-P

2.3. Transferul grupelor acil.

2.3.1.6. Acetil-CoA: cholin-o-acetil-transferaza (cholin-acetil-transferaza)


Acetil-CoA + Cholina ⇌ CoA + o-Acetil-cholina.

2.6. Transferul grupelor azotice.

2.6.1.1. L-aspartat: 2-cetoglutarat-aminotransferaza (aspartat-aminotrans-feraza)


L-aspartat + 2-cetoglutarat ⇌ Oxaloacetat + L-glutamat

2.7. Transferul grupelor ce conțin fosfor:

a) ca acceptor servește grupa alcoolică:

2.7.1.1. ATP: D-hexozo-6-fosfat transferaza (hexokinaza).


ATP + D-hexoza $\rightleftharpoons$ ADP + D-hexozo-6-P

2.7.1.11. ATP: D-fructozo-6-fosfat-1-fosfotransferaza (fosfofructokinaza)


ATP + D-F-6-P $\rightleftharpoons$ ADP + D-F-1,6-diP

2.7.1.40. ATP: piruvat-fosfotransferaza (piruvatkinaza)


ATP + Piruvat $\rightleftharpoons$ ADP + Fosfoenolpiruvat

b) ca acceptor servește grupa fosfat:

2.7.4.3. ATP: AMP-fosfotransferaza (adenilatkinaza):


ATP + AMP $\rightleftharpoons$ ADP + ADP

2.8. Transferul grupelor ce conțin sulf.

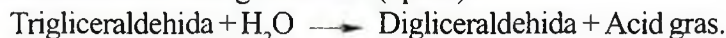
2.8.2.1. 3'-fosfoadenilil-sulfat: fenol-sulfotransferaza (aril-sulfotransferaza)


3'-PAS + Fenol $\rightleftharpoons$ Adenozin-3',5'-diP + Aril-sulfo-eter.

3. Hidrolazele catalizează reacțiile de hidroliză, cu utilizarea moleculelor de apă.

3.1. Acționează asupra legăturilor esterice.

3.1.1.3. Hidrolaza esterilor glicerolului (lipaza).


Trigliceraldehida + H_2O $\rightarrow$ Digliceraldehida + Acid gras.

3.2. Acționează asupra compușilor glicozilici.

3.2.1.1. α-1,4-glucan-4-glucano-hidrolaza (α-amilaza)
Hidrolizează legăturile 1-4 în polizaharide.

3.3. Acționează asupra legăturilor eterice.

3.3.1.1. S-adenozil-L-homocistein-hidrolaza (adenozil-homocisteinaza)


S-adenozil-L-homocisteina + H_2O $\rightarrow$ Adenozina + L-homocisteina

3.4. Acționează asupra legăturilor peptidice.

3.4.1.2. Aminopeptidaza. Hidrolizează di- și tripeptidele, scindînd restul N-terminal.

3.4.4.1. Pepsina. Hidrolizează peptidele prin grupele aminice ale aminoacizilor aromatici sau ale acizilor dicarboxilici.

3.5. Acționează asupra legăturilor C-N.

3.5.1.2. L-glutamin-amidohidrolaza (glutaminaza)


L-glutamina + H_2O $\rightarrow$ L-glutamat + NH_4^+

3.5.1.5. Carbamid-amidohidrolaza (ureaza)


Ureea + H_2O $\rightarrow$ CO_2 + $2NH_3$

3.6. Acționează asupra legăturilor anhidrice.

3.6.1.8. ATP - pirofosfohidrolaza (ATP-aza)


ATP + H_2O $\rightarrow$ AMP + PP_i

4. Liazele catalizează adiția la legăturile duble și reacțiile inverse.

4.1. C-C liazele

4.1.1.1. Carboxiliaza 2-cetoacizilor (piruvat decarboxilaza)


2-cetoacid $\rightarrow$ Aldehidă + CO_2

4.1.2. Aldehid-liazele.

4.1.2.7. Cetozo-1-fosfat-aldehid-liaza (aldolaza).



4.1.3. Liazele cetoacizilor.

4.1.3.7. Citrat-oxaloacetat-liaza (CoA acetilată) (Citrat-sintaza sau citrat -enzima de condensare)

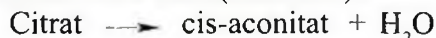


4.2. C-O liazele.

4.2.1.2. L-malat-hidro-liaza (fumaraza)



4.2.1.3. Citrat-hidro-liaza (aconitaza).



5. Izomerazele determină transferul grupelor în interiorul moleculei, cu formarea izomerilor.

5.1. Racemazele şi epimerazele.

5.1.1.1. Alanin racemaza.



5.1.3.2. UDP-glucozo-4-epimeraza.



5.3. Oxidoreductazele intramoleculare.

5.3.1.1. D-gliceraldehid-3-fosfat-cetoizomeraza (triozofosfat-izomeraza)



5.4. Transferazele intramoleculare.

5.4.2.1. D-fosfoglicerat-2,3-fosfomutaza (fosfogliceratfosfo mutaza)



6. Ligazele catalizează reacţiile, formînd legăturile covalente cu utilizarea ATP.

6.1. Formarea legăturilor C-O.

6.2. Formarea legăturilor C-S.

6.2.1.1. Acetat: CoA-ligaza (ATP) (acetil-CoA-sintetaza)



6.3. Formarea legăturilor C-N.

6.3.2.3. γ-L-glutamil-L-cistein: glicin-ligaza (ATP)(glutation-sintetaza)



6.4. Formarea legăturilor C-C.

6.4.1.1. Piruvat: CO_2- ligaza (ATP) (piruvat-carboxilaza).



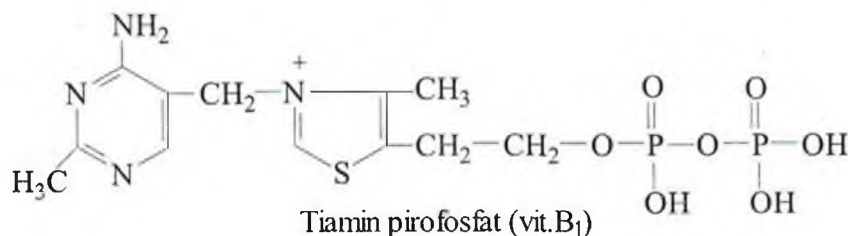
6.4.1.2. Acetil-CoA: CO_2-ligaza (ADP) (Acetil-CoA-carboxilaza).



COENZIMELE

Drept constituenți coenzimatici servesc *vitaminele*. Ele nu reprezintă materie structurală (de felul proteinelor, glucidelor, lipidelor), nu au valoare energetică, dar participă la multiple și variate reacții metabolice. Pentru îndeplinirea acestor roluri funcționale organismul are nevoie de cantități mici de vitamine. Animalele superioare și omul au pierdut capacitatea de a sintetiza vitamina, și conținutul ei în rația alimentară e obligatorie.

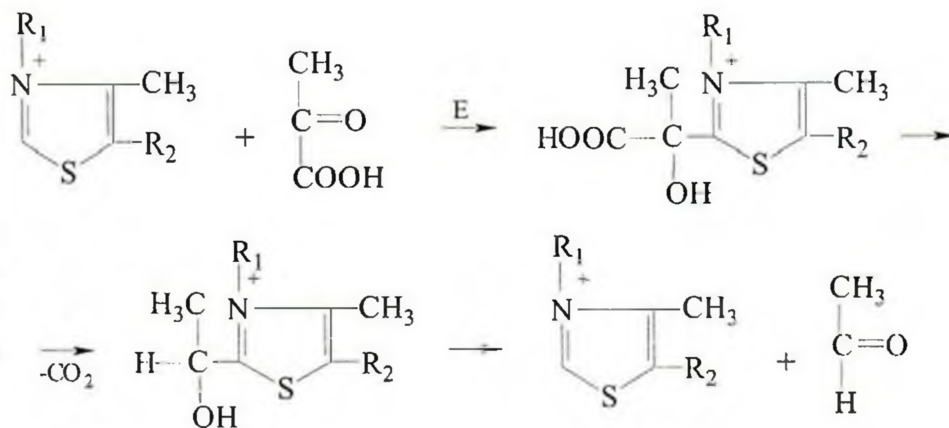
Vitamina B_1. Drept coenzimă servește forma ei activă — tiamin pirofosfatul.



Tiamin pirofosfat (vit.B_1)

Participă la reacții enzimatice de transfer al unei unități de aldehidă activă (în reacția de decarboxilare oxidativă a α-cetoacizilor - piruvat, α-cetoglutarat), în reacția de transcetolare a metabolismului glucidic; se include în alte complexe multienzimatice.

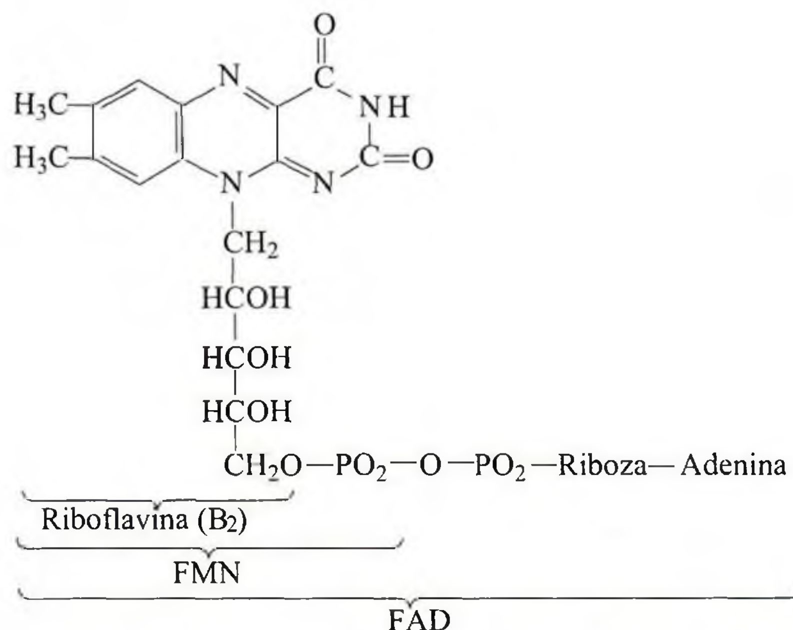
În ciclul tiazolic, datorită ionizării azotului (N^+), carbonul C_2 devine carbanion și declanșează un atac nucleofil asupra C_2 din molecula acidului piruvic. Ca urmare, se formează un compus de adiție, care apoi se decarboxilează, rezultînd hidroxietil TPP. Ulterior, acesta elimină acetaldehidă și regenerează TPP.



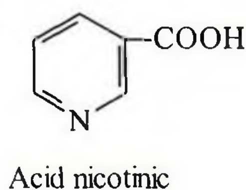
La insuficiența de vitamină B_1 suferă dereglări sistemul nervos central, sistemul cardiovascular, tractul gastrointestinal, drept consecință a deficitului de energie, prin defectarea degradării glucozei.

Vitamina B_2 — *riboflavina* — e componenta coenzimelor flavinice.

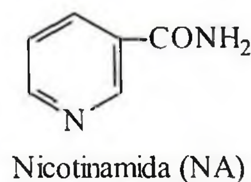
Centrul activ al enzimelor conține unele metale, de aici și denumirea enzimelor respective — metaloflavoproteine. FAD și FMN sunt coenzime implicate în procesele de oxidoreducere. Enzimele respective se numesc *flavoenzime* sau *flavoproteine*. În cadrul reacțiilor de oxido-reducere, concomitent, ciclul izoaloxazinic suferă reduceri reversibile prin fixarea la azotul N(1,10) a 2 atomi de hidrogen preluați de la substrat — substratul se oxidează, iar flavinele se reduc — $FMNH_2$ sau $FADH_2$. Acest sistem FAD - $FADH_2$ sau FMN - $FMNH_2$ dispune de un potențial electric standard.



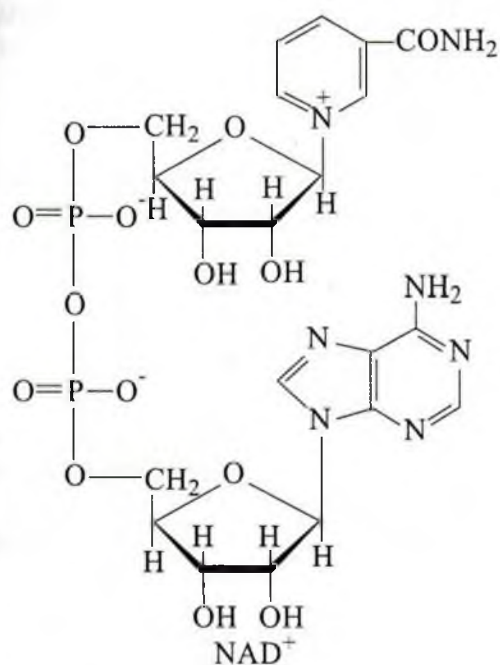
Vitamina PP — *niacina, niacinamida, B_5*. Se include în structura a două coenzime nicotinamidice, care participă la reacțiile de oxidoreducere — NAD^+ și $NADP^+$. Ambele contribuie la dehidrogenarea substraturilor — transferul unui hidrid-ion —H^- (H^+ și $2e^-$), alt proton se permută în soluție (H^+). Legătura cu componenții proteici este slabă (enzimele NAD^+ dependente participă la procesele catabolice, cele $NADP^+$ dependente anabolice).

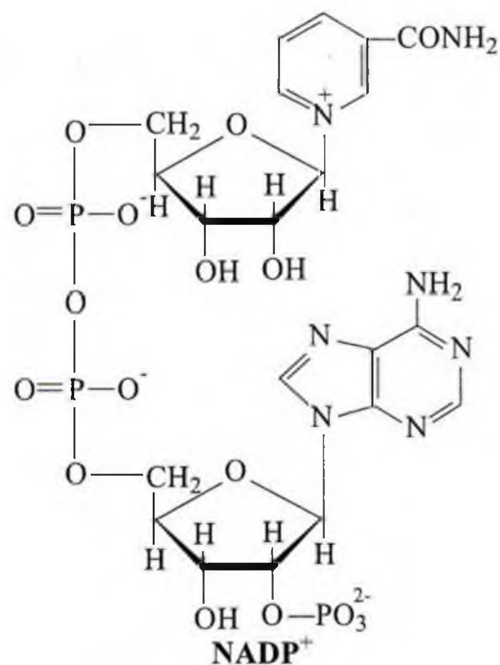


Acid nicotinic

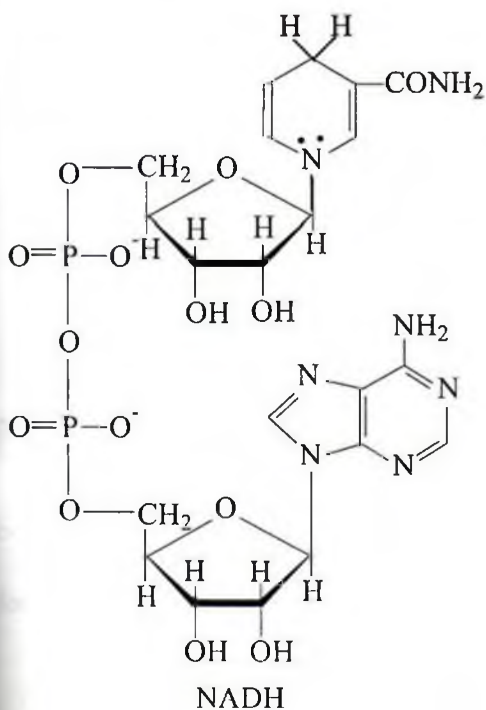


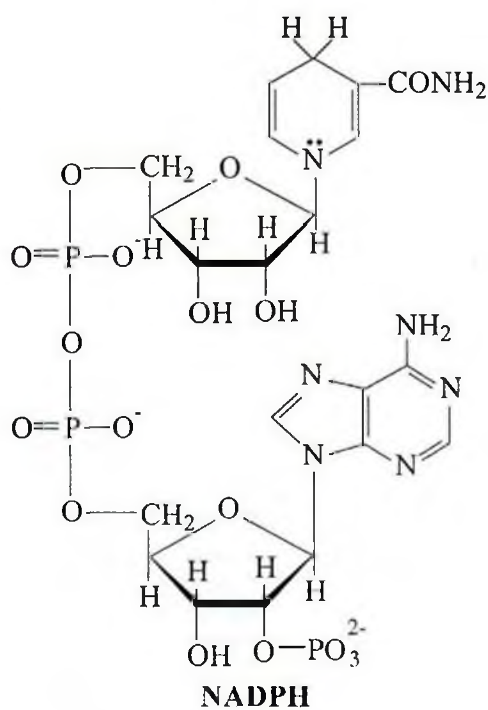
Nicotinamida (NA)





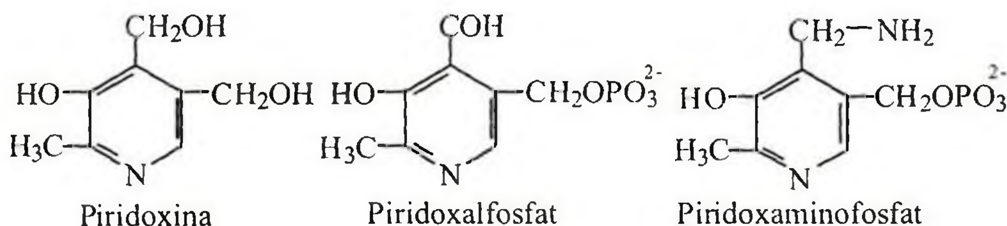
Structura NAD^+ şi $NADP^+$





Structura NADH şi NADPH

Vitamina B_6—*piridoxina*. Drept coenzimă servesc formele active—piridoxalfosfat şi piridoxaminfosfat.



Enzimele B_6 dependente iau parte la:

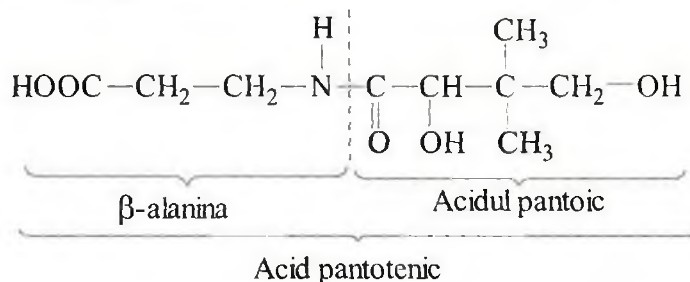
1) procesele de transaminare, transformînd un aminoacid în cetoacid şi, viceversa, servind ca coenzimă în aminotransferaze (mecanismul "ping-pong") prin formarea de baze Schiff intermediare;

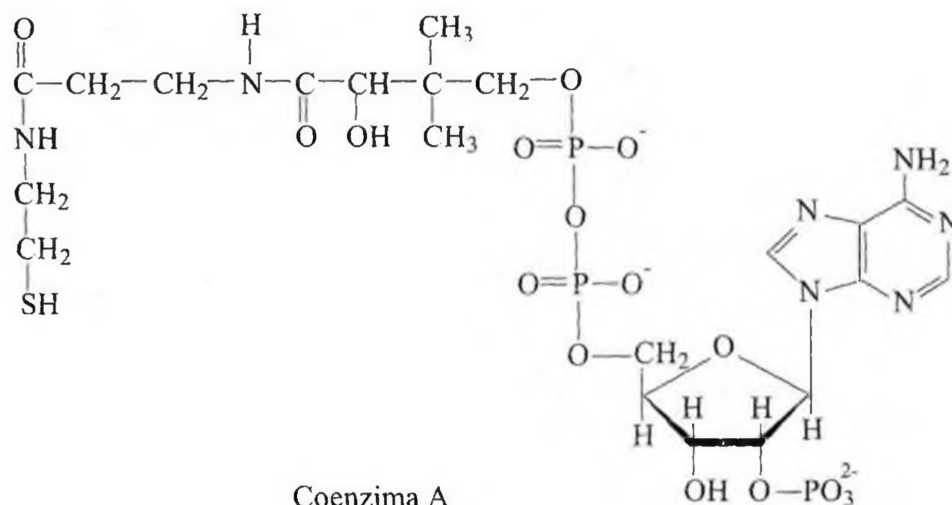
2) reacţiile de decarboxilare a aminoacizilor, aplicîndu-se acelaşi mecanism;

3) procesul de transsulfurare a unor aminoacizi;

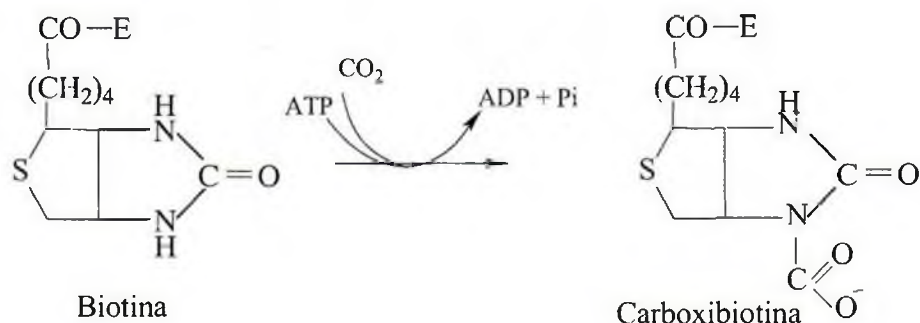
4) determinarea activităţii glicogen fosforilazei (degradarea glicogenului).

Vitamina B_3—*acidul pantotenic* —componenta CoA. Conlucrează la transferul grupelor acil, datorită grupului reactiv SH cu formarea tioesterilor.



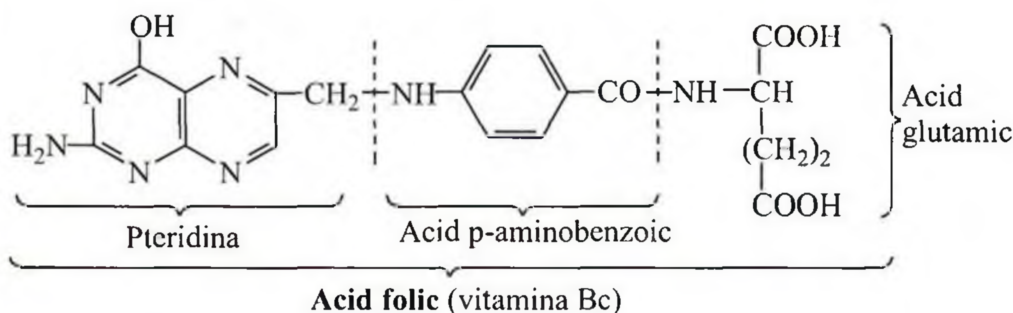


Vitamina H — *biotina* — serveşte drept coenzimă a carboxilazelor ce leagă CO_2 şi-l transferă la substraturi. CO_2 se activează, unindu-se cu biotina şi utilizînd ATP.



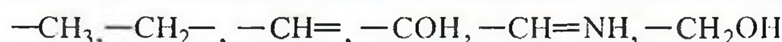
Biotina Carboxibiotina

Vitamina Bc - *acidul folic.* Vitamina Bc în organism se reduce, formînd fermentativ acidul tetrahidrofolic (FH_4) ce serveşte drept coenzimă (5,6,7,8), transferînd de la o moleculă la alta grupările atomilor de carbon în cadrul diverselor reacţii fermentative.



Acid folic (vitamina Bc)

Grupările atomilor de carbon care sunt transferate de către acidul folic:



$—CH_3, —CH_2—, —CH=, —COH, —CH=NH, —CH_2OH$

Vitamina C — *acidul ascorbic* (organismul uman nu e apt să-l sintetizeze).

Vitamina C joacă un rol esenţial la:

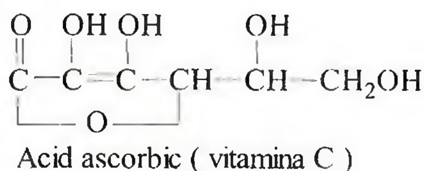
1. Reacţii de hidroxilare, cu implicarea O_2.

2. Hidroxilarea poate avea loc şi în baza reducerii formei oxidative (pe seama acidului dehidroascorbic).

Triptofanul ⟶ 5-hidroxitriptofan.

3. Diverse reacţii de oxidoreducere, în care funcţionează cuplat cu glutationul sau coenzimele NAD^+ si FAD - dependente.

4. Drept cofactor activator al anumitelor enzime (degradarea oxidativă a tirozinei, formarea adrenalinei, etc).

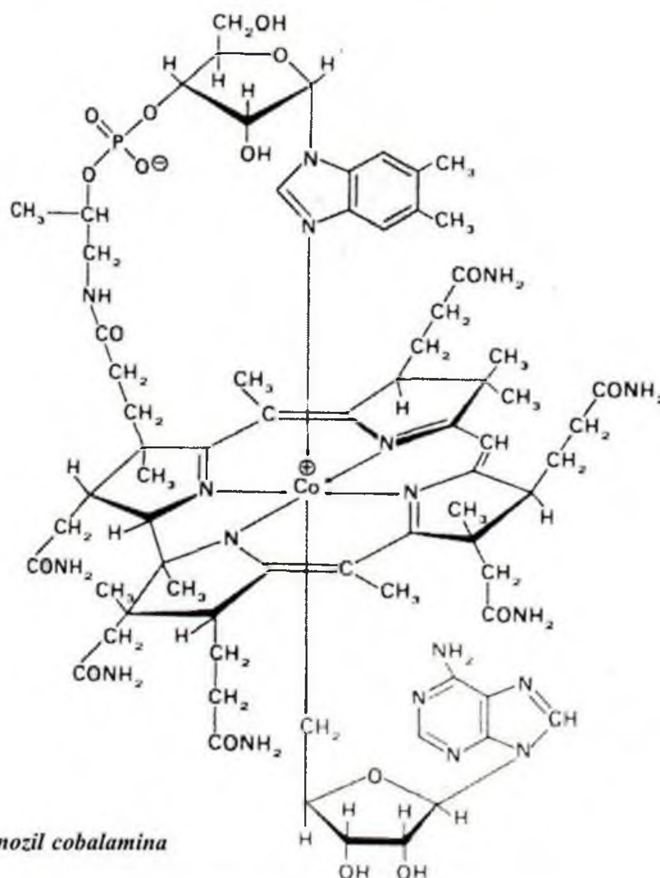


Acid ascorbic (vitamina C)

Vitamina B_{12} — *ciancobalamina* — posedă o structură complicată, depistată în 1957. Gruparea CN din coenzimă este substituită prin adenozil. Serveşte drept coenzimă pentru unele transmetilaze şi anumite mutaze (izomeraze):

1. La transformarea homocisteinei în metionină, se utilizează FH_4 ca donator de CH_3, dar enzima acceptă metil-cobalamina drept coenzimă.

2. La transformarea metilmalonil CoA în succinil CoA (restructurarea scheletului de atomi de C), drept coenzimă serveşte 5-dezoxiadenozil cobalamina.

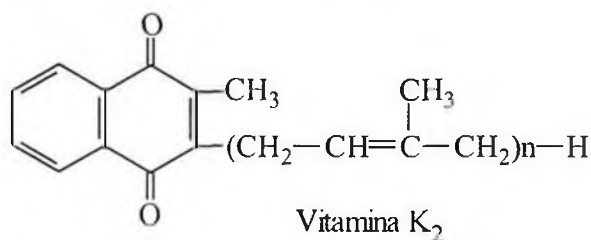


Structura 5-dezoxiadenozil cobalamina

Vitaminele liposolubile:

Vitamina K serveşte drept cofactor al sistemului enzimatic (carboxilaza), ce exercită carboxilarea acidului glutamic în gama-carboxiglutamic cu asocieri de oxigen. Acest acid se conţine în protrombină (10 resturi de acid) ce poate chelata calciul.

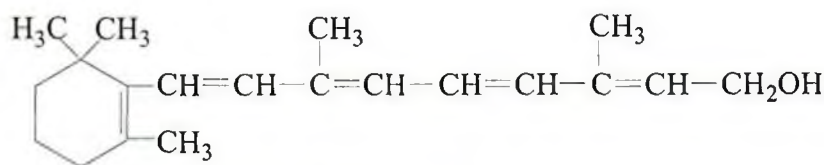
Se presupune că ea participă activ la fosforilarea oxidativă, fiindcă sub acţiunea antivitaminelor K acest proces se decuplează. Vitamina K e necesară pentru coagulare (vezi capitolul respectiv).



Vitamina K_2

Vitamina A — *retinolul* — este un derivat poliizoprenoidic, care conține nucleul ciclohexenului și mai multe unități izoprenice.

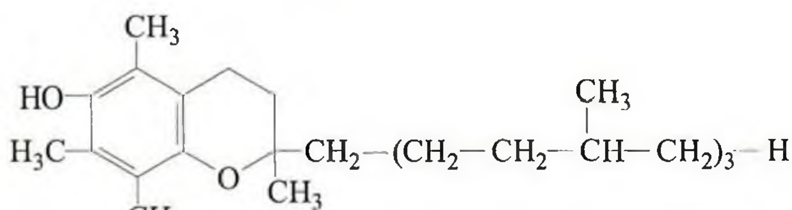
Retinolul (retinalul) este un component al rodopsinei din bastonașele retinei (opsina și 11-cis-retinal).



Retinol (vitamina A)

La absorbția de către rodopsină a cuantumurilor de lumină are loc descompunerea ei în opsină și trans-retinal, care vor izomera în cis sub influența enzimei specifice — retinol izomeraza. Acidul retinoic participă la transportul prin stratul bilipidic al oligozaharidelor încorporate în glicoproteine (grație modificărilor cis-trans.)

Vitamina E este un antioxidant. Ea protejează celulele de diverși oxidanți toxici, exclude oxidarea vit.A, a acizilor grași esențiali. Conlucrează cu selenul în procesele antioxidante și previne, de altfel, acțiunea distructivă a peroxizilor.



Vitamina E

Pentru funcționarea normală a organismului sunt necesare și unele ***microelemente*** în cantități mici (miligrame). Ele funcționează drept *cofactori* sau *grupe prostetice*. Rolul pe care-l comportă:

1. Au funcție catalitică vizavi de o anumită reacție chimică, viteza căreia se amplifică în prezența proteinei fermentative (Fe, Cu).

2. Ionul poate forma simultan un complex cu substratul și centrul activ al enzimei și, atașîndu-se, trec în formă activă, modificînd conformația.

3. La un stadiu anumit al ciclului catalitic, ionul de metal joacă rolul de acceptor al electronilor — sunt antrenate metaloenzimele.

4. Ionii stabilizează structura enzimelor.

Exemple de diverse enzime ce conțin metale:

Fe: Citocromoxidaza, catalaza, peroxidaza, proteinele fiero-sulfidice (nu conțin hem, ci un număr par de Fe și S într-o formă labilă).

Cu: Liziloxidaza şi citocromoxidaza, conlucrînd la împachetarea colagenului şi elastinei.

Zn: Enzimele NAD^+ dependente, alcool dehidrogenaza, RNA şi DNA polimerazele, carbanhidraza, carboxipeptidazele.

Între Zn^{2+} şi Cu^{2+} sunt sesizabile fenomenele de antagonism, la fel ca şi între Mg^{2+} şi Ca^{2+}.

Îngrăşămintele minerale conţin sulfat de amoniu, care surclesează *selenul* necesar pentru activitatea glutation peroxidazei (scindării H_2O_2). Organismul uman, pentru funcţionarea lui normală mai necesită: *nichel* — urează; *crom* — pentru asimilarea glucozei de către ţesuturi; *plumb* — pentru procesul de calcifiere a scheletului; *cobalt* — intră în componenţa vit. B_{12}; *molibden* — în structura xantin oxidazei.

Metaloproteinazele reprezintă o grupă importantă de enzime care comportă o activitate majoră în celulele tumorale, activitate ce corelează cu procesul invaziv şi metastazic. Toate au structură asemănătoare, dar diferă după tipul de proteină ce scindează. Exemplu: scindarea colagenului (IV) din membrana bazală.

Metaloproteinazele se sintetizează în forma neactivă determinată de o secvenţă foarte conservatoare de 9 aminoacizi. La acest capăt se află cisteina foarte reactibilă, care leagă metalul în centrul activ al enzimei şi "blochează scindarea", adică capacitatea de a scinda proteinele - ţintă.

Ce iniţiază scindarea acestui peptid, transformînd MP în forma activă?

S-a stabilit că forma activă a metaloproteazelor nu acţionează în prezenţa inhibitorului tisular al proteazei (TIMP) — o familie de proteine ce reglează creşterea ţesutului. Celula tumorilor la fel le sintetizează, activitatea fermentativă fiind determinată de echilibrul acţiunii pozitive şi negative a proteinelor reglatoare. TIMP sunt supresori ai metastazei, depistîndu-se deja gena absentă sau inactivă din tumorile maligne. Proteina — produsul ei — lipseşte în celulele cancerigene.

Celulele ce nu metastazează, conţin cantităţi mari de proteină nm 23 (nonmetastazic), corelînd cu trecerea celulelor de la stare normală la tumoare, cu capacitate de invaziune. Determinarea proteinei joacă un rol important în diagnosticul, pronosticul şi tratamentul bolnavului (cancer mamar).

Cum inhibă proteina procesul metastazic al celulelor?

Proteina activă nm 23 favorizează adiţia grupelor fosfat la moleculele proteice, modificînd transferul semnalelor ce influenţeaza creşterea celulelor.

Pe parcursul a milioane de ani de evoluţie proteina dată nu s-a modificat, şi practic rămîne intactă atît la om, cît şi la ***awd.*** La ultima e absolut necesară pentru dezvoltarea normală a organelor ce se diferenţiază din epiderma embrionului - creierul, ochii, aripile, picioarele, organele genitale. Se poate de presupus, după analogie, că şi la om proteina joacă un rol determinant în organizarea şi comunicarea intercelulară. Reglarea aberantă a nm 23 conduce, în consecinţă, la o stare celulară nestabilă, ce stimulează comportări autonome ale celulelor cancerigene şi metastazarea lor.

Modificările comunicaţiei intercelulare, prin intermediul preparatelor sintetice, precum şi modificările fluxului de ioni de calciu în celule pot bloca metastazele celulelor cancerigene.

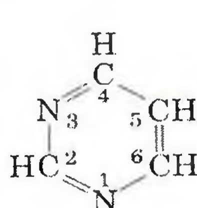
CAPITOLUL II. ACIZII NUCLEICI

Studiile fundamentale (1868) ale lui F. Mischer au pus temelia chimiei nucleului celular. Dînsul a extras nucleele celulelor din puroiul tifoanelor chirurgicale utilizate şi a demonstrat că în aceste nuclee se află un compus ce conţine fosfor, pe care l-a denumit nucleină. S-a constatat că aceasta e o nucleoproteidă. Drept izvor de nucleoproteide serveşte timusul. Această glandă se utilizează ca materie experimentală pentru toate investigaţiile ştiinţifice. A fost nevoie de decenii de cercetări, pînă cînd mai multe generaţii de savanţi au stabilit compoziţia chimică a acizilor nucleici şi componentelor lor de bază.

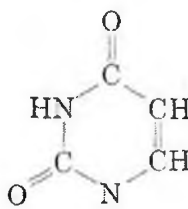
STRUCTURA CHIMICĂ

Acizii nucleici sunt compuşi macromoleculari, degradînd hidrolitic în nucleotide şi nucleozide, de altfel ei sunt polinucleotide, compuşi dintr-un număr foarte mare de mononucleotide. La hidroliza completă degradează şi mononucleotidele, generînd baze azotate (purinice şi pirimidinice), pentoze şi acid fosforic în cantităţi echimolare.

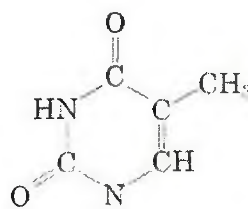
Bazele azotate pirimidinice sunt derivaţi ai pirimidinei, se întîlnesc în acizii nucleici. De notat trei baze majore: *uracilul, citozina şi timina.*



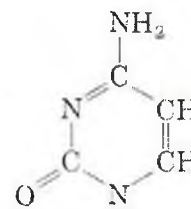
Pirimidina



Uracilul
2,4-dioxipirimidina

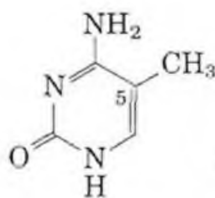


Timina
5-metil-2,4-dioxipirimidina

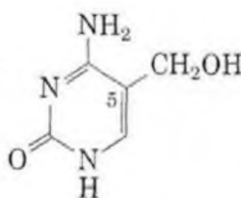


Citozina
2-oxi-4-aminopirimidina

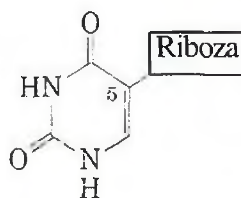
Există şi unele *baze minore pirimidinice* ca: *5-metil-citozina şi 5-hidoximetil-citozina, metiluridina, tiouridina, pseudouridina.*



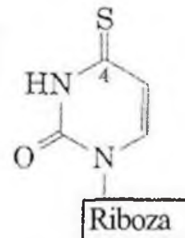
5-metil-citozina



5-hidroximetil-citozina

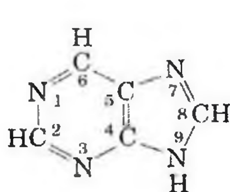


Pseudouridina (ψ)

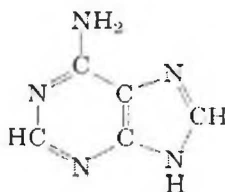


4-tiouridina

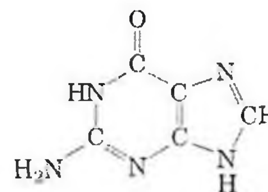
Acizii nucleici conțin și *baze purinice — adenină și guanină*. Purina este derivatul pirimidinei: molecula conține inele condensate ale pirimidinei și imidazolului.



Purina

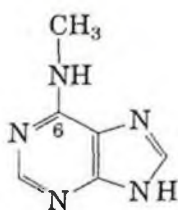


Adenina
(6-amino-purina)

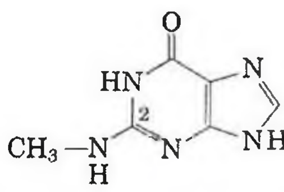


Guanina
(2-amino-6-oxipurina)

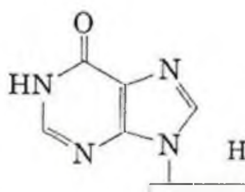
Se întîlnesc în acizii nucleici și *baze purinice minore* ca: *2-metil-adenina, 6-metil-adenina, 1-metil-guanina, 7-metil-gunina și inozina*. Bazele minore se conțin în circa 5% și diferă mult de la o specie la alta.



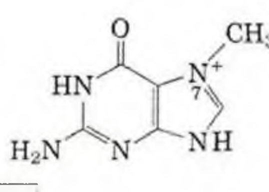
6-metil-adenina



2-metil-guanina



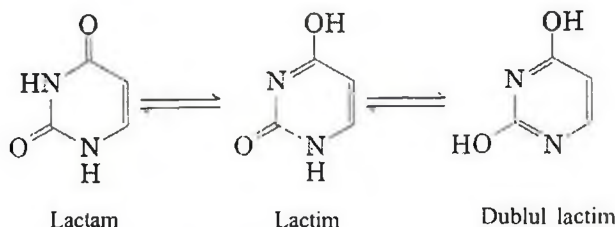
Inozina



7-metil-guanina

Proprietățile

Bazele azotate prezintă *fenomenul de tautomerie* (structuri ce diferă prin poziția unui atom de hidrogen și a unei duble legături): formele lactim sau lactam, ultimele mai stabile, predomină în structură.



Lactam Lactim Dublul lactim

Bazele azotate sunt slab solubile în apă; cele pirimidinice au o structură plană, cele purinice — aproape plană, puțin pliată. Bazele pirimidinice sunt mai stabile decît cele purinice. Bazele azotate posedă maximă capacitate de absorbție de ultraviolet (între 260-280 nm), ceea ce permite determinarea cantității de acizi nucleici (cu atît mai mult ai componentelor- baze, nucleozide). Pentru identificare se utilizează și cromatografia etc.

La o hidroliză menajată nucleotidele degradează în nucleozide și acid fosforic.

Nucleozidul constituie N-nucleozide ale bazelor purinice sau pirimidinice, în care glucidul, pentoza (riboza sau dezoxiriboza) cu atomul său de C_1 formează legătura glicozidică cu N_1 (pirimidina) sau N_9 (purina). Legătura glucozidică în nucleozidele naturale este β. *Pentozele* sunt prezente în forma furanozică, formînd legătura cu hidroxilul semiacetalic.

Distingem ribonucleozide şi dezoxiribonucleozide. Nucleozidele sunt mai solubile în apă decît bazele azotate, mai stabile în soluţii alcaline şi uşor se hidrolizează la încălzire în mediul acid, producînd baze libere şi pentoze. În organism nucleozidele sunt hidrolizate de nucleozidaze specifice. Denumirea nucleozidelor derivă de la bazele azotate prin adăugarea sufixelor: *-ozina*, pentru derivaţii purinici şi *-idina*, pentru cei pirimidinici. Adenina şi riboza rezultă în *adenozină*, respectiv: *guanozina*; aceiaşi analogi — cu dezoxiriboza; uridina, citidina, timina, cu dezoxiriboza, se numeşte *timidină*, iar compusul timinei din tRNA poartă denumirea de *riboziltimină*.

Din punct de vedere steric, nucleozidele pot avea două conformaţii: *sin* şi *anti*. Forma anti este caracteristică compuşilor naturali, fiind cerută de aşezarea corectă a bazelor complementare în structura dublu helicoidală a DNA. În forma Z conformaţia sin alternează cu anti.

Esterii fosforici ai nucleozidelor egaleaza cu nucleotidele la legăturile C_5 şi C_3 ale pentozei. În dezoxiribonucleotide se manifestă numai aceste două poziţii, iar ribonucleotidele se completează şi cu poziţia C_2. Modificînd condiţiile de hidroliză, se pot obţine toate tipurile. Celulele în stare liberă cooptează, preponderent în poziţia 5', grupa fosfat. Structural, pentoza sau dezoxipentoza ocupă o poziţie de legătură între fosfat şi baze azotate.

Nomenclatorul nucleotidelor şi nucleozidelor

BAZELE	Purinice		Pirimidinice		
	Adenina (A)	Guanina (G)	Citozina (C)	Uracilul (U)	Timina (T)
Nucleozidul în: RNA DNA	Adenozina dAdenozina	Guanozina dGuanozina	Citidina dCitidina	Uridina	Timidina
Nucleotidul în: RNA DNA	Adenilat dAdenilat	Guanilat dGuanilat	Citidilat dCitidilat	Uridilat	Timidilat
Nucleozid difosfaţi	ADP dADP	GDP dGDP	CDP dCDP	UDP	TDP
Nucleozid trifosfaţi	ATP dATP	GTP dGTP	CTP dCTP	UTP	TTP

Ambele mononucleotide reprezintă acizi deosebit de activi şi se află sub formă de 5'-mono, di- sau trifosfaţi. Grupa fosfat 2 şi 3 uşor poate fi hidrolizată de enzime specifice, fără scindarea altor legături.

Rolul nucleotidelor

1. Element structural al acizilor nucleici.

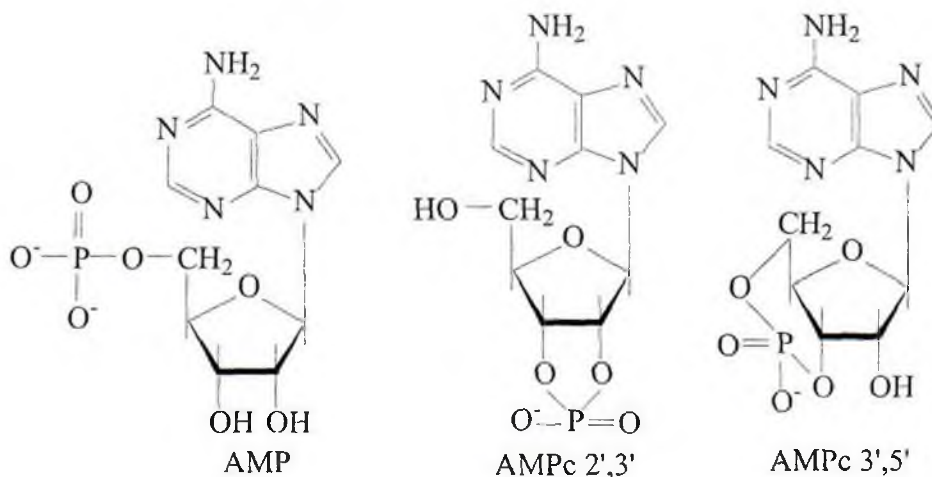
2. ATP — purtătorul energiei chimice în celulă, serveşte la transferul grupelor fosfat macroergice şi prezintă cheia de legătură între procesele ce decurg cu eliminarea, degajarea energiei şi între cele ce utilizează energia. ADP şi AMP se formează în rezultatul defosforilării ATP, fosforilînd pînă la ATP în procesul respiraţiei tisulare. Ciclul ADP-ATP în celulă constituie sistemul principal de transfer al grupei fosforice.

3. Acizii nucleici iau parte la transferul unor blocuri de construcţie (acidul acetic, glucoza, cholina), transformîndu-le în substanţe biologice active — uridinddifosfatglucoză, citinddifosfatcholina etc.

4. Servesc ca precursori macroergici ai unităţilor mononucleotidice la sinteza fermentativă a DNA şi RNA, cedînd grupa pirofosfat, se transformă în resturi de nucleozidmonofosfat — baza structurală a lanţului polinucleotidic.

5. Unele mononucleotide primordiale conţin şi alţi compuşi - nicotinamida în nicotinamidmononucleotid, precursorul NAD, vit. B_2 în flavinmononucleotid şi FAD.

6. În organisme sunt prezente 2 feluri de esteri fosforici ai nucleotidelor (AMP, ADP, ATP), în alte cazuri fosfatul leagă 2 atomi de O_2 ai pentozei în cadrul aceluiaşi nucleotid, formîndu-se nucleotide ciclice - 2',3' şi 3',5'.



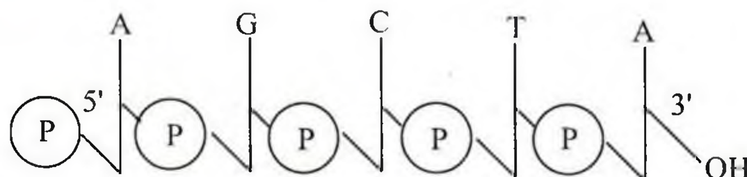
AMP AMPc 2',3' AMPc 3',5'

Produsul 2',3' rezultă ca intermediar la degradarea ribonucleotidelor, pe cînd AMPc 3',5' este un ribonucleotid natural, ce posedă proprietăţi unice şi o activitate biologică deosebită, reglînd metabolismul ca mesager al efectului hormonal.

DNA. Structura primară. Polinucleotidele sunt realizate prin stabilirea legăturilor covalente între nucleotidele ce se succed în lanţ. Gruparea 3'-hidroxil a unui nucleotid este legată de gruparea 5'-hidroxil a mononucleotidului următor prin legătura fosfodiesterică. Atît DNA, cît şi RNA au proprietăţi comune chimice şi fizice — sunt greu solubile în soluţii acide, dar uşor se extrag din ţesut cu ajutorul soluţiilor de săruri neutre şi fenol.

Bazele azotate sunt responsabile de informația genetică, pe cînd grupele glucidice și fosfatul au o funcție structurală. DNA — conceptul actual structural s-a format prin anii 1950. Moleculele de DNA din celulele tuturor speciilor sunt compuse din 4 mononucleotide dAMP, dGMP, dCMP și TMP, legate intr-o secvență variată cu punțile 3',5'-fosfodiesterice. Dar raportul și succesiunea nucleotidelor, greutatea moleculară a DNA din diferite organisme vor fi diferite. Se înregistrează și o cantitate nu prea mare de derivați metilați ai bazelor.

DNA e un polimer cu o catenă extrem de mare — zeci de mii de unități monomere. Lanțul poate fi reprezentat schematic în felul următor: pentru baze servesc simbolurile: A,G,C,T; liniile verticale corespund pentozelor, iar linia diagonală cu simbolul P reprezintă legătura fosfodiesterică — ea leagă capătul unei linii verticale cu mijlocul celeilalte. Locusul legării corespunde 3'-OH și 5'-OH.



Lanțul are o direcție și o polaritate specifică — capetele 5'-OH și 3'-OH care nu sunt angajate într-o legătură internucleotidică. S-a convenit că structura unei catene polinucleotidice va fi indicația strictă de la capătul 5' spre stînga, iar cel 3' — spre dreapta. Direcția 5' ⟶ 3'.

Pîna la mijlocul secolului trecut enigma DNA nu era descoperită, pe cînd istoria DNA începe cu F. Mischer. În 1944, O.Colin, C.McLeod și M.McCarty au demonstrat că acizii nucleici de tipul dezoxi sunt factorul determinant în transformările extractului de pneumococi III — formele nevirulente se transformau în virulente, la adăugarea DNA extrase din formele virulente ale pneumococilor. Proprietățile virulente se transmit prin ereditate.

Cu ajutorul izotopilor radioactivi, Alfred Hershey și Martha Chase au demonstrat că informația genetică pentru replicarea virusului T_2 în celulele *Escherichia coli* e transmisă nu de componenta proteică, dar de DNA. S-a constatat că anume DNA este componenta cromozomilor, purtătoarea informației genetice în celulele vii.

Un merit major la descoperirea tainelor structurii DNA îi aparține lui Erwin Chargaff, care, la sfîrșitul anilor 40 al secolului trecut, a ajuns la următoarele concluzii:

1. Preparatele de DNA obținute din țesuturile aceleiași specii de organisme au componența nucleotidică identică.

2. Componența nucleotidică a DNA e diferită la diferite specii.

3. Componența nucleotidică a DNA la aceeași specie nu se modifică cu vîrsta, nu depinde de alimentare și de influența mediului ambiant.

4. Numărul resturilor de adenină în orice DNA, indiferent de specie, este egal cu cel al timinei A = T; G = C. Din acest raport rezultă că A + G = T + C.

Aceste relații au facilitat înțelegerea codificării informației genetice în DNA și transmiterii de la o generație la alta. *Secvența mononucleotidelor în lanțul polinucleotidic al*

DNA reprezintă structura sa primară, structura covalentă. Această structură e stabilizată de legăturile fosfodiesterice.

Structura secundară. În 1953, J.Watson și F.Crick au depistat structura tridimensională a DNA și au propus mecanismul posibil al replicației — un fenomen excepțional în istoria biologiei, ce a deschis calea conceptului funcționării genei la nivel molecular. Ei au analizat tabloul difracției razelor X, efectuate pe cristale de DNA de către R.Franklin și M.Wilkins, au propus modelul structural, care în linii generale e justificat și constă în următoarele caracteristici:

1. Două lanțuri polidezoxiribonucleotidice se răsucesc helicoidal în jurul unei axe comune. Lanțurile au sens opus, sunt antiparalele, formînd o dublă elice cu orientare spre dreapta (fig.2.1).

2. Bazele azotate, hidrofobe sunt orientate spre interior și perpendicular pe axa elicei, inelele glucidice, legate prin resturi fosfat, constituie scheletul extern al dublului helix și sunt orientate aproape sub un unghi drept față de baze. Toate grupările fosfat la pH = 7 sunt ionizate și încărcate negativ (fig. 2.2).

3. Cilindrul ce încadrează dublul helix are un diametru de 20Å, distanța între bazele azotate învecinate e de 3,4 Å, iar poziția uneia față de alta este de 36 grade. Structura se repetă după 10 nucleotide, avînd o perioadă de identitate (pasul) de 34Å (3,4nm) (fig. 2.3.).



Figura 2.1. *Spirala de DNA, potrivit axei spiralei*

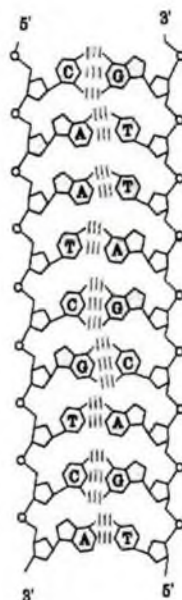


Figura 2.2. *Modelul spiralei duble de DNA — bazele ocupă interiorul, iar scheletul glucido-fosforic— exteriorul cilindrului*

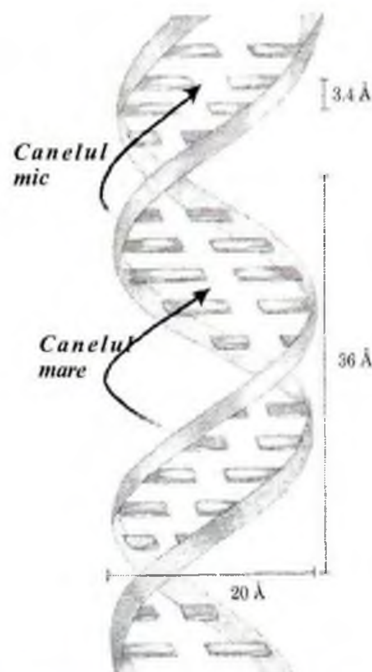


Figura 2.3. *Modelul schematic al dublului helix de DNA. Structura se repetă după 36 Å, ce corespunde la 10 resturi în fiecare catenă*

4. Stabilitatea dublului helix e asigurată de interacțiunile hidrofobe între bazele azotate, precum și de legăturile de hidrogen ce se stabilesc între bazele azotate de pe o catenă și cele complementare de pe cealaltă. Dublul helix este de tip plectonemical — (adică transversal în același plan), și nu paranemical (adică longitudinal). Legăturile de hidrogen determină primordial împerecherea specifică a bazelor.

5. În secțiune, dublul helix are trei straturi:

a) unul intern, cu bazele nucleice;

b) unul mijlociu — glucidic — cu planurile dispuse radiar;

c) altul periferic — resturi de acid fosforic;

d) cele două catene delimitează pe suprafața moleculei 2 caneluri: mare și mic (fig. 2.4.).

6. Nu există limitări în succesiunea bazelor azotate din lanțul polinucleotidic; o anumită secvență determină o informație genetică concretă.

O proprietate primordială a dublului helix e împachetarea specifică a bazelor azotate.

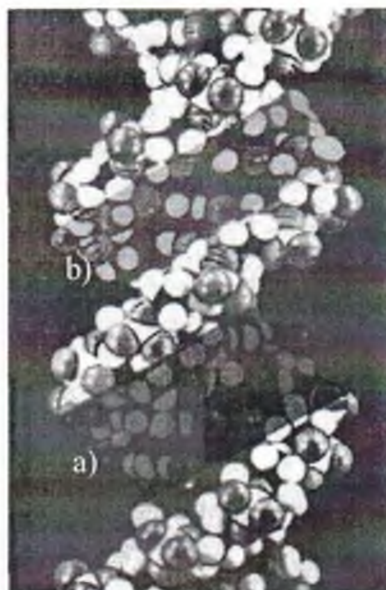
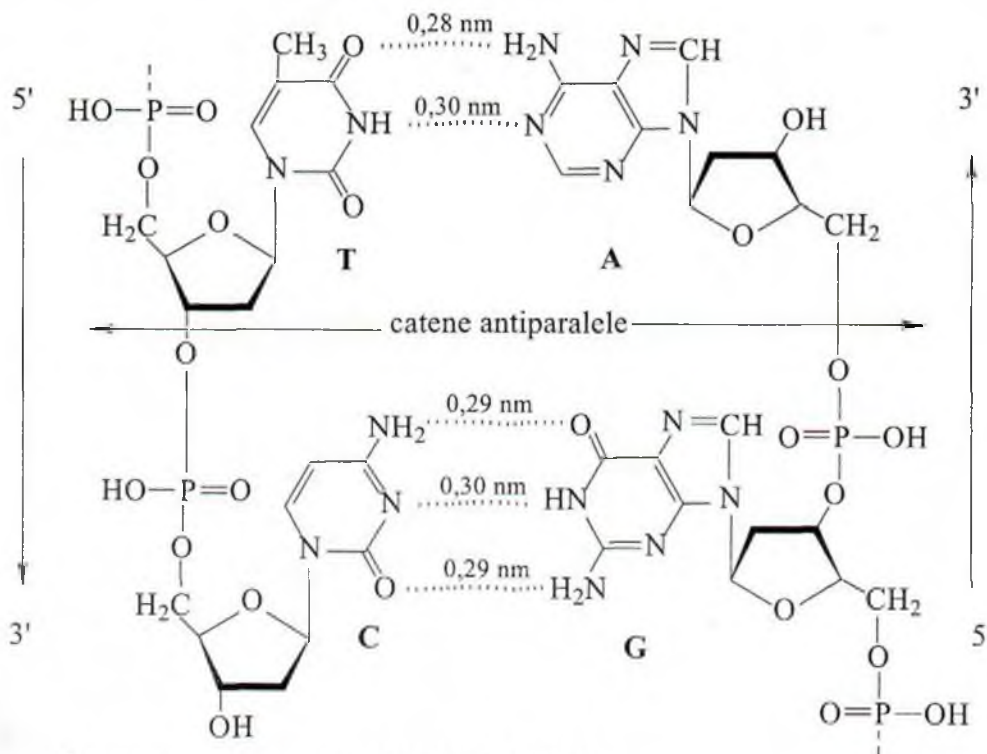


Figura 2.4. ***Modelul spațial al dublului helix de DNA. Se văd cele 2 caneluri - mare (a) și mic (b)***



Structura unui fragment din dublul helix de DNA

Reieşind din limitările sterice şi din capacitatea de a forma legătura de hidrogen, se postulează că adenina se împerechează numai cu timina, guanina cu citozina. Acest spaţiu poate fi ocupat numai de perechea purin-pirimidinică: pentru 2 purine e mic, pentru 2 pirimidine — e mare şi nu pot forma legături de hidrogen. Împachetarea depinde şi de regulile de formare a legăturii de hidrogen. Hidrogenul ocupă o anumită poziţie în baze. Adenina nu se poate împerechea cu citozina, la fel cum guanina nu se poate împerechea cu timina, fiindcă în locul unei legături s-ar găsi doi atomi de hidrogen, iar în alt loc — nici unul.

Adenina formează cu timina două legături de hidrogen, pe cînd guanina cu citozina — trei. Orientarea acestor legături şi depărtarea dintre ele e optimă pentru o interacţiune puternică între baze.

E de menţionat că *cele două catene antiparalele ale dublului helix de DNA nu sunt identice nici după succesiunea bazelor, nici după componenţa lor. Ele sunt numai complementare una faţă de alta. Una conţine adenina, cealaltă neapărat timina; guaninei îi corespunde citozina.*

Investigaţiile efectuate la două Universităţi din Cambridge au confirmat că s-a sintetizat, cristalizat şi descifrat structura a două fragmente de DNA deosebite. În mijlocul lor se află o secvenţă, în care catena conţine multe A, iar cea complementară — T. E curios faptul că această DNA are proprietăţi uimitoare — e rezistentă la acţiunea factorilor externi. Care-i cauza? Aceeaşi α-elice de dreapta, în care A şi T în fiecare pereche sunt dispuse una faţă de alta aidoma elicelor la elicopter, adică nu sunt în acelaşi plan. Efectul este neordinar: 1) e mai îngust canelul spiralei; 2) NH_2 a A ocupă o poziţie de mijloc între O_2 a două T învecinate, formînd legături de hidrogen în plus cu T din lanţ — o legătura verticală ce joncţionează longitudinal stivele de baze azotate. Rezultă o rezistenţă mai mare la factorii nocivi ai mediului. Astfel, legăturile sunt proprii şi proteinelor, dar în DNA s-au stabilit pentru prima dată.

În dependenţă de cantitatea de apă şi forţa ionică a mediului, configuraţia dublului helix al DNA se poate modifica. Este elocventă prezenţa cîtorva forme de DNA. *Forma B* — spirala clasică a lui Watson şi Crick — conţine 10 resturi, ca perioadă de identitate e de dreapta şi planul bazelor e perpendicular pe axa spiralei. *Forma A* - pasul — e compus din 11 resturi şi planul deviază aproximativ cu 20 grade faţă de perpendiculară de pe axa spiralei. Se formează la dehidratarea formei beta. Dacă A îndeplineşte rolul de matrice în transcripţie, apoi B — rolul de matrice la replicarea DNA (ambele sunt în confomaţia anti). *Forma Z* e răsucită spre stînga, conţine 12 resturi la pas (fig. 2.5).

Dublul helix are o rezistenţă deosebită, concordată cu rolul de purtător al informaţiei genetice. Nu este o structură rigidă, fixată pe toată lungimea ei. Ea este supusă permanent unor deformaţii interne, ce oscilează de la o parte a moleculei la alta, adică posedă un anumit dinamism. Acestor devieri le e caracteristică dependenţa de anturajul extern al moleculei de DNA.

Structura terţiară. În procesul de izolare a DNA s-a stabilit că în unele segmente dublul helix poate fi împachetat într-o *structură tridimensională* — superhelix sau formă deschisă - inelară, ce presupune integritatea catenei, dar nu formă geometrică.

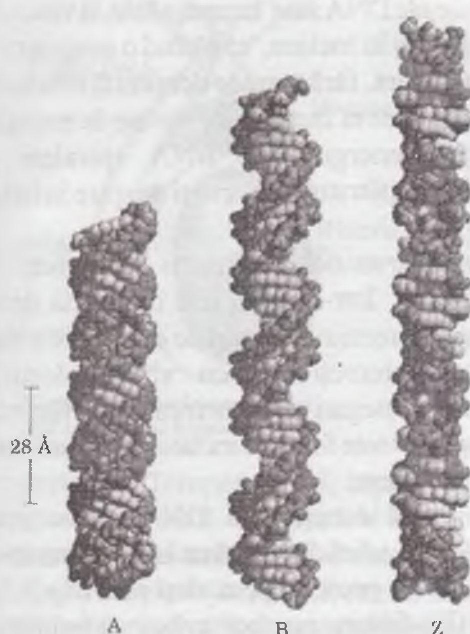


Figura 2.5. ***Compararea formelor A,B şi Z de DNA. Structurile se deosebesc după pasul spiralei şi orientarea perechilor de baze faţă de axă (20^0, 6^0, 7^0), diametrul (26Å, 20Å, 18Å), distanţa dintre bazele azotate învecinate (2,6Å; 3,4Å; 3,7Å)***

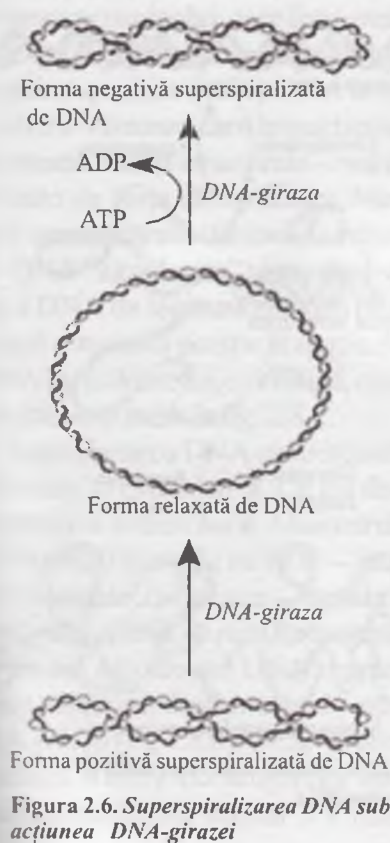


Figura 2.6. ***Superspiralizarea DNA sub acţiunea DNA-girazei***



Figura 2.7. ***Lk număr. În poziţia (a) este egal cu 1, iar în (b) = 6***

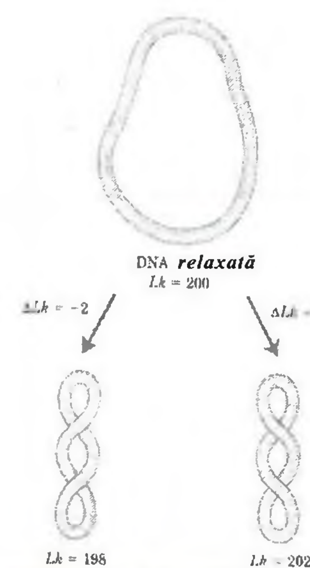


Figura 2.7a. ***Superspirala negativă şi pozitivă***

Unele molecule ale DNA sunt liniare, altele, la virusuri, se pot transforma în inelare, căpătînd o proprietate nouă. Forma inelară, fără spire, e denumită relaxată. Pentru transformarea ei în spirală e nevoie de energie. Se consideră că energia unei DNA spiralate e proporţională cu pătratul numărului de spire în helix (fig. 2.6).

Superspiralizarea denotă funcţii biologice: 1) împachetarea DNA într-o formă mai compactă decît cea relaxată; 2) determină gradul de desfacere a dublului helix şi interacţiunea cu alte molecule. Superspiralizarea negativă favorizează desfacerea helixului. Aproape toate formele inelare din natură sunt negativ superspiralizate.

O caracteristică esenţială a DNA inelar este numărul de răsuciri, adică de cîte ori un lanţ îl va întretăia pe altul, dacă se vor proiecta pe acelaşi plan (fig.2.7). Acest număr (Lk- linking number) trebuie să fie întreg, e o caracteristică tipologică şi poate varia, dacă într-un lanţ sau în ambele se fac rupturi. S-au izolat enzime ce au atare funcţie.Densitatea superhelicală (σ) reprezintă relaţia dintre diferenţa numărului de spiralizări (ΔLk) faţa de numărul de spire prezente în DNA relaxată (Lk_0) $\sigma=\Delta Lk/Lk_0$. Semnul negativ al densităţii superhelicale indică superspiralizarea negativă a DNA — underwound, iar σ pozitiv — superspiralizarea pozitivă — overwound (fig 2.7.a)

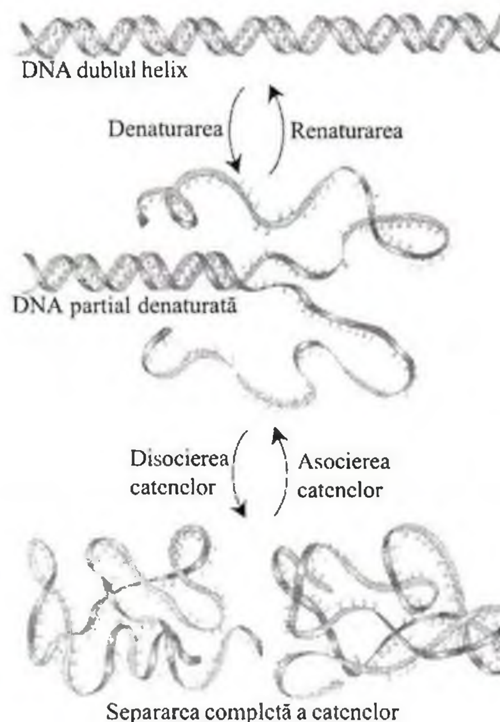


Figura 2.7b. ***Denaturarea reversibilă şi renaturarea DNA***

O particularitate distinctivă a moleculei de DNA naturale e lungimea ei — lanţul DNA al omului constituie aproximativ 2 m; organismul dispune de aproximativ 10^{13} celule. Lungimea tuturor DNA ale omului este de $2x10^{10}$ km. Comparăm cu distanţa pînă la Soare — $1,44x10^{8}$ km şi perimetrul Pămîntului $4x10^{4}$ km. Unitatea de lungime egală cu 1000 perechi sau nucleotide este o kilobază (aproximativ are o masă moleculară egală cu 660 kDa şi o lungime de 3,4 mkm).

Încălzind soluţia de DNA, adăugînd acid sau bază, putem disocia catenele

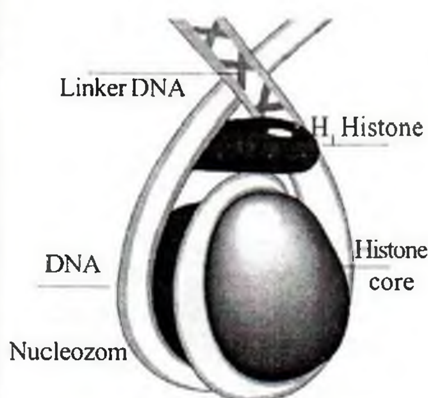


Figura 2.8. ***Nucleozomul cu DNA linker şi histonele H_1***

de DNA. La o anumită temperatură are loc procesul de desfacere a dublului helix - *denaturarea lui.* Degradarea unei jumătăţi de structură spiralică are loc la temperatura de topire. Dublul helix e o structură cu un grad mare de cooperativitate. Temperatura de topire depinde de componenţa nucleotidică. Moleculele bogate în C şi G au o temperatură mai înaltă decît cele înnobilate cu A şi T. Dacă temperatura e mai joasă decît cea de topire, lanţurile de DNA reasociază cu formarea dublului helix, producîndu-se regenerarea — *renaturarea* (fig 2.7.b).

Aproape tot DNA în celula eucariotelor se află în cromatina nucleului, care formează *cromozomi* înaintea mitozei. Cromatina conţine DNA (35%), RNA (5%), proteine specifice (60%). DNA în cromatină este legat de *proteine-histone*, care împachetează compact DNA şi formează unităţi structurale — *nucleozomi.* Ele sunt stabilizate de forţe electrostatice. Nucleozomii au o structură asemenătoare formei discului.

DNA "încolăceşte" histonele. Între nucleozomi se situează DNA de legătură (linker) (fig. 2.8.). Nucleozomii ocupă o anumită poziţie în spaţiu. Modelul împachetării DNA în nucleozomi, cromatină, cromatide — cromozomi mitotici este redat în fig. 2.8.a.

Împachetarea DNA cu proteinele în spaţiu reprezintă structura sa *cuaternară*. Un rol deosebit îl au *hertonele* — proteine nehistonice. Diametrul unei superspirale de DNA e egal în medie cu 90 Å — într-o spiră sunt localizate 80 de perechi de baze — pasul ei.

Cristalografia cu raze Roentgen a constatat că buclele pe care se încolăceşte DNA reprezintă octameri, fiecare fiind constituit din 8 molecule proteice a cîte $2H_4$, $2H_3$, H_2A şi H_2B (fig 2.8.b). Octamerul este înfăşurat de DNA (dublul helix) cu lungimea de 146 nucleotide — nucleozomul, ce recent s-a confirmat, cu ajutorul



Figura 2.8a. ***Modelul împachetării DNA în cromozomi***

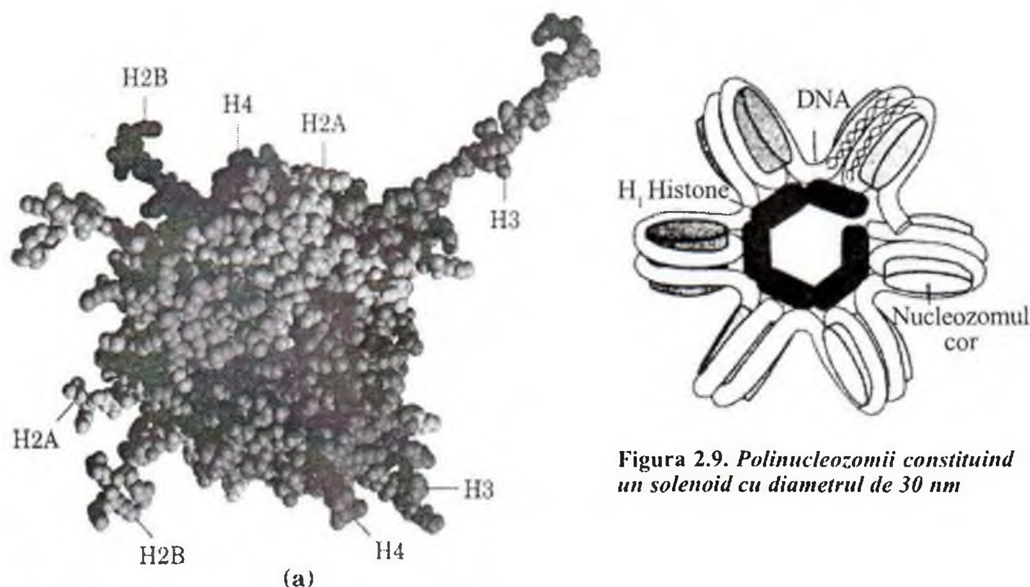


Figura 2.8b. ***Reprezentarea spațială a proteinelor în nucleozom***

Figura 2.9. ***Polinucleozomii constituind un solenoid cu diametrul de 30 nm***

nucleazelor. În cromatina eucariotelor polinucleozomii formează un superhelix, dispunîndu-se după un solenoid cu un pas de 10 nm şi diametrul de 30 nm (fig. 2.9.). Molecula H_1 de histone este ataşată de partea exterioară a catenei de DNA şi de ambele capete ale DNA de legătură. S-a stabilit că proteinele ce formează octamerul nucleozomului nu se deosebesc mult la diferite specii — nu există o diferență esențială a succesiunii aminoacizilor, ceea ce confirmă că nu doar împachetarea DNA constituie funcția acestor proteine. În caz contrar, n-ar fi fost nevoie de a păstra timp de milioane de ani consecutivitatea aminoacizilor, fiindcă orice proteină cu un conținut mare de aminoacizi pozitivi, ar determina împachetarea DNA încărcat negativ. În alte capitole vom examina rolul acestor histone în reglarea genelor.



J.Watson



F.Crick

STRUCTURA RNA

Acizii ribonucleici sunt produşi macromoleculari, fiind rezultanţi ai policondensării ribonucleotidelor. Nucleotidele se racordează prin fosfat diesteric 3' 5'. Numărul de nucleotide variază de la 75 - la multe mii. Structura covalentă a RNA se deosebeşte de DNA prin următoarele:

1. Restul de zahăr e riboza, dar nu dezoxiriboza.

2. Una din bazele azotate în RNA e uracilul şi nu timina care formează o pereche cu adenina. De rînd cu aceste baze majore, RNA mai conţine baze "minore", rezultînd din metilarea, tiolarea celor majore.

3. Molecula de RNA este monocatenară (cu excepţia viruşilor). De aceea, compoziţia nucleotidică nu se supune legităţii complementare — conţinutul de adenină nu e egal cu al uracilului şi al guaninei cu citozina, adică structura dublă catenară complementară pentru RNA este exclusă. Se evidenţiază însă unele porţiuni, unde complementaritatea bazelor permite organizarea în structuri duble helicoidale. Porţiunile de baze necomplementare sunt expulzate în forme de bucle în afara zonelor de dublu helix. Împachetarea bazelor nu e perfectă, unele dintre ele nefiind complementare. Cota dublului helix în diferite RNA variază mult, atingînd 50%. Cantitatea de RNA, spre deosebire de cea de DNA, variază de la o celulă la alta şi chiar în cadrul aceleiaşi celule, în funcţie de intensitatea proceselor metabolice.

Deosebim 3 tipuri de RNA:

RNA mesager (mRNA) (informaţional, matriceal) — fiecărei gene îi corespunde molecula sa de mRNA, de aceea acest tip de RNA este foarte heterogen. Conceptul de mRNA a fost postulat de F.Jacob şi J.Monod în 1961. Studiind reglarea sintezei proteinelor la *E.coli*, au ajuns la concluzia prezenţei unui mesager structural de durată scurtă ce transmite mesajul genetic din nucleu în citoplasmă şi are următoarea caracteristică:

1. acest intermediar trebuie sa fie polinucleotid;

2. componenţa nucleotidică trebuie să corespundă celei din DNA ce o codifică;

3. este foarte heterogen după lungime. Savanţii nominalizaţi au presupus că trei nucleotide codifică un aminoacid şi au constatat că masa mesagerului nu e mai mare de 500 kDa;

4. e asociat temporar cu ribozomii — loc de sinteză a proteinelor;

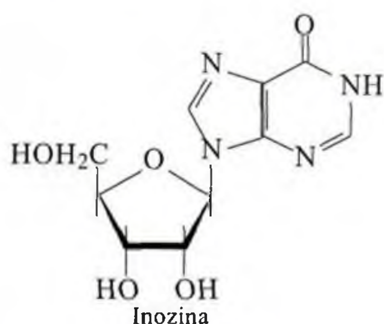
5. se sintetizează şi degradează foarte rapid.

Savanţii au demonstrat experimental cele argumentate şi, ca rezultat, au mai concluzionat: ribozomii sunt structuri nespecializate ce sintetizează în anumit moment acea proteină care este codificată de mRNA şi se află în ribozomi.

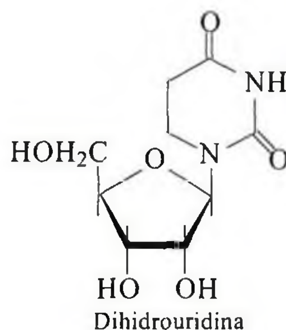
Folosind metoda hibridizării propusă de Sol Spiegelman (1961), s-a constatat că secvenţa bazelor în mRNA e complementară secvenţei din DNA matriceal.

Lungimea catenei de mRNA e dependentă de lanţul polipeptidic ce implică sintetizarea. mRNA poate să mai conţină secvenţe neinformative la capătul 5' terminal de diferită lungime (lider). Dacă mRNA conduce un singur mesaj, e numită *monogenă*, dacă mai multe — *poligenă*. Ea poate conţine regiuni intergene netranslabile denumite "linker". Timpul de supravieţuire e variabil (minute - ore). Nucleazele reprezintă enzimele ce degradează acizii nucleici.

RNA de transfer (tRNA) reprezintă 10-20% din RNA celular, fiind molecule mici (70-90 nucleotide) cu o masă moleculară de circa 30.000 Da. În structura primară, pe lîngă cele 4 nucleotide majore (A,G,C,U), se mai întîlnesc pseudouridina, A,G,C metilate. Pseudouridina (vezi mai sus) -C-1 al ribozei este legată în poziția 5 (C5) a uracilului (nu e legătura N-glicozidică, ci C-C). Sunt prezente dihidrouridina, inozina — nucleozidul ribozei şi al hipoxantinei.



Inozina



Dihidrouridina

Moleculele de tRNA reprezintă o conformație aidoma "foii de trifoi", unde mai mult de 1/2 din baze sunt complementare. Toate moleculele de tRNA posedă particularități structurale comune, fiindcă toate interacționează în acelaşi mod cu mRNA şi ribozomii cu enzimele ce catalizează activarea aminoacizilor şi formarea legăturilor peptidice (fig. 2.10.).

Caracteristica tRNA:

1. Sunt monocatenare cu un număr mic de ribonucleotide.

2. Conțin baze minore (metilate) — metilarea împiedică împachetarea unor baze capabile de alte interacțiuni, modifică capacitatea hidrofobă a unor segmente de RNA.

3. Posedă 4 zone de perechi complementare şi 3 necomplementare, expulzate în formă de bucle:

a) capătul 5' terminal are rest guanilic fosforilat;

b) capătul 3' terminal - secvența nucleotidă CCA. Aminoacidul activat se leagă de 3'-OH al adenozinei;

c) la capătul buclei inferioare se află porțiunea anticodon compusă din 7 baze - Pir - Pir - X - Y - Z, purină modificată, bază variabilă. Tripletul (XYZ) e complementar secvenței nucleotidice din mRNA;

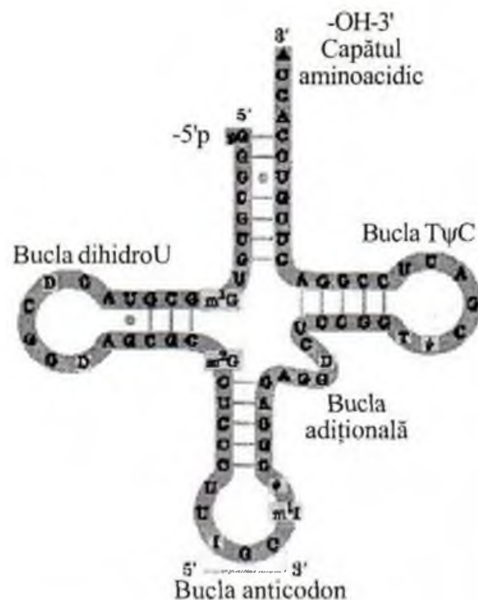


Figura 2.10. ***Structura tRNA ala cu secvența nucleotidică***

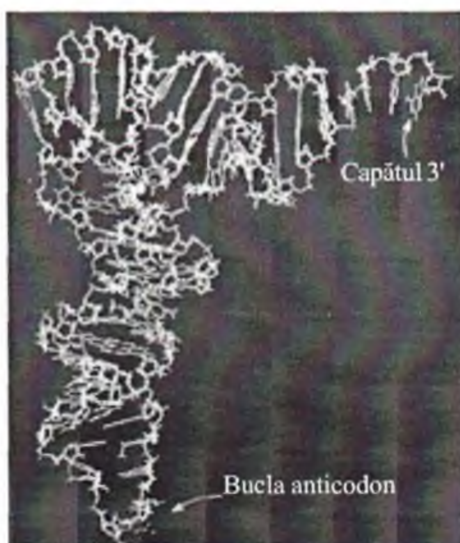


Figura 2.11a. *Fotografia structurii tridimensionale a tRNA Phe din drojdii*

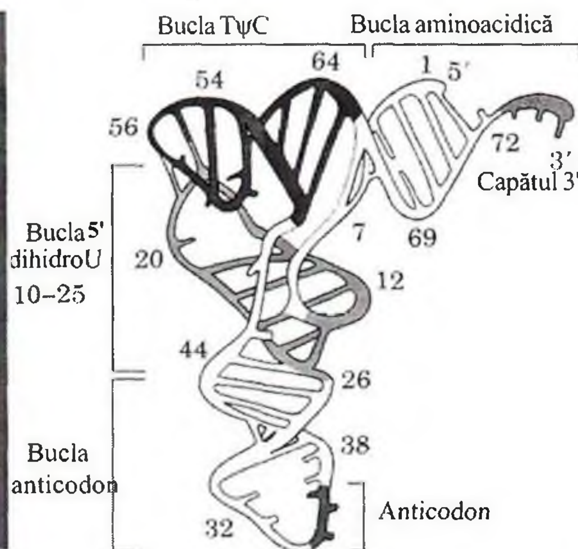


Figura 2.11b. *Imaginea schematică a structurii tridimensionale a tRNA Phe din drojdii*

d) secvențele normale din bucla TΨC riboziltimidilat asigură legarea în ribozom a complexului AA - tRNA sintetazic cu rRNA;

e) secvența de nucleotide din bucla dihidrouridinică recunoaşte o anumită secvență din rRNA ce se leagă cu AA tRNA sintetază.

Studiile cristalografice au stabilit structura tridimensională a tRNA (fig.2.11. a şi b).

1. Are forma de L.

2. Molecula include 2 segmente de dublu helix situate perpendicular — fiecare helix are circa 10 perechi de baze.

3. Majoritatea bazelor formează în afara spiralei legături de hidrogen deosebite. Interacțiuni terțiare apar între baze necomplementare (A-A, C-G, A-C). Resturile ribozofosfat pot interacționa cu baze şi între ele (2-OH pentoza). Multe baze sunt aranjate în stive.Această interacțiune hidrofobă determină arhitectonica moleculară.

Viruşii segregă RNA mono sau bicatenar în molecule native împachetate în membrana proteică (specificitate).

rRNA (RNA ribozomal) sunt macromolecule flexibile şi deformabile, conțin mai puține baze metilate decît tRNA; zonele duble catenare sunt întrerupte de zone monocatenare, extrem de heterogene după formă şi mărime. În funcție de constanta de sedimentare distingem mai multe tipuri. Fiecare tip are structura sa tridimensională. Din totalul de RNA celular rRNA îi revine aproximativ 75%. rRNA se leagă cu diverse proteine, constituind o particulă ribonucleoproteică denumită *ribozom*, care este ataşat reticulului endoplasmatic (fig. 2.12).

Ribozomii pot disocia reversibil în 2 subunități 50S şi 30S la procariote (A) şi 60S-40S la eucariote (B). Subunitatea mare integrează rRNA 23S, 5S şi 34 tipuri de proteine L34 (large-mare). Subunitatea mică - rRNA - 16S şi 21 proteine S21 (small-mică). La eucariote — respectiv, vezi fig.2.12.

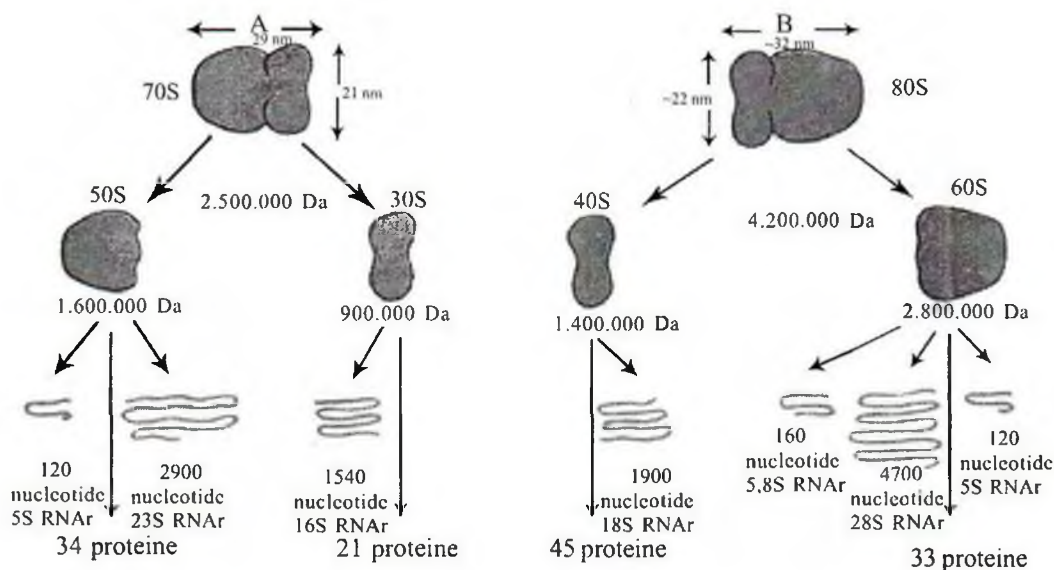


Figura 2.12. ***Structura ribozomului la procariote (A) şi la eucariote (B)***

În 1987 a fost elaborată harta situării celor 21 proteine în subunitatea 30S la *E.coli*. Modelul tridimensional al proteinelor e practic canonizat şi e inclus în manualele contemporane de biochimie. Utilizarea metodei bombardării cu tritiu (planigrafii cu tritiu) a permis stabilirea perfectă a proteinelor expuse la suprafaţa subunităţii ribozomale şi celor din interior. S-a constatat că suprafeţele de contact ale subunităţilor la asociere în ribozomul integru nu au proteină, adică subunităţile interacţionează numai cu RNA-ul lor. Studiile mai recente (1996) au confirmat conturul subunităţii 30 S în corespundere cu ultimele date ale microscopiei crioelectronice, ceea ce a permis corectarea hărţii tridimensionale a interpoziţiei proteinelor în această subunitate.

Pe suprafaţa fiecărui ribozom se profilează 2 situsuri: situsul aminoacidic (A) şi situsul peptidilic (P). Experienţele efectuate de Masayasu Nomura, prin metoda asamblării subunităţii mici, au demonstrat că:

1) Toată informaţia necesară pentru asamblare se conţine în componentele ei structurale.
2) Pentru asamblare nu sunt necesari factorii neribozomali.

REPLICAREA (BIOSINTEZA DNA)

Organismele vii trebuie să-şi păstreze nu numai integritatea secvenţei nucleotidelor din DNA (repararea), dar să-şi reproducă foarte exact şi subtil DNA propriu în mitoza celulară. Enzimele replicării acţionează perfect şi rapid (la bacterii într-o secundă se polimerizează pînă la 500 nucleotide). Operativitatea şi precizia sunt datorate unui complex multienzimatic — mecanism perfect compus din diferite proteine.

În procesul de replicare informaţia codificată în secvenţa bazelor moleculei de DNA parental este transferată cu o exactitate maximă celulei-fiice de DNA. Replicarea se bazează pe împachetarea complementară a bazelor nucleice. Activitatea matriceală a DNA se manifestă prin faptul că secvenţa nucleotidică se reproduce prin această împachetare complementară a bazelor (fig. 2.13).

Replicarea constă în desfacerea dublului helix parental şi construirea catenelor pe fiecare dintre cele 2 catene complementare — replica celor dintîi. Rezultă 2 molecule de DNA identice cu parentala. Fiecare dintre ele conservează o catenă parentală veche. Aşadar, procesul replicării e *semiconservativ*.



Figura 2.13. ***Replicarea DNA după J.Watson şi F.Crick***

Precizările lui J.Watson şi F.Crick au fost confirmate de M.Meselson şi F.Stahl, care au cultivat Escherichia coli în diferite medii cu izotopi marcaţi. În 1956 a fost descrisă prima enzimă ce catalizează polimerizarea fermentativă — *DNA - polimeraza*. Procesul de biosinteză este deosebit de complex şi necesită următoarele:

1. Prezenţa matricei DNA (templată).
2. Prezenţa celor 4 dRN trifosfaţi — dATP, dGTP, dCTP si TTP.
3. Prezenţa ribonucleozid trifosfaţilor — ATP, GTP, CTP, UTP.
4. Prezenţa ionilor de magneziu.
5. Sistem multienzimatic în baza constituenţilor:

a) *helicaza* — enzimă ce realizează desfacerea dublului helix parental în două catene complementare. Desfacerea decurge treptat, în porţiuni mici de DNA, pe măsură ce replicarea avansează. Cele două catene vor rămîne separate ca urmare a intervenţiei proteinelor de stabilizare (SSB) a DNA monocatenare. La desfacerea unei perechi de baze se utilizează minimum 2 molecule de ATP. Un rol important la desfacere îi revine unei enzime — *topoizomerazei*;

b) *RNA primaza* sintetizează mici fragmente de RNA - primer;

c) *DNA polimeraza* preia indicaţiile de la matricea care decide secvenţa mononucleotidelor în catena nou-sintetizată (o sintetizează în direcţia 5' ⟶ 3'). Enzima are şi o acţiune exonucleazică, excizînd nucleotidele de la ambele capete ale catenei.

Sunt atestate trei enzime de DNA-polimeraza (I, II, III). Enzima exercită şi funcţia de control a replicării, asigurînd procesului o eficienţă sporită. Cele expuse sunt confirmate prin:

1. Sinteza ce evoluează în prezenţa celor 4 dezoxiribonucleotidtrifosfaţi şi a DNA matriceal.

2. Componenţa nucleotidică a DNA sintetizat, dependent de caracterul matricei, dar nu de numărul relativ al nucleotidelor.

3. Cea mai convingătoare probă - DNA fagului FX174 replicat *in vitro* de DNA polimerază e complet contagioasă — erorile la sinteză sunt extrem de rare.

d) *DNA - ligaza* — enzima ce catalizează formarea legăturilor fosfodiesterice între 3'-OH ale unui fragment şi 5'- monofosfat ale celuilalt. Reacţia necesită ATP sau NAD^+ (la procariote). Capetele trebuie să aparţină moleculelor bicatenare de DNA, în cadrul reconstituirii sau splicing-ului catenei de DNA la recombinarea genetică. Procesul decurge în felul următor:



1. $E + ATP \rightleftharpoons E\text{-}AMP + PP_i$

(aminogrupa lizinei din enzimă se leagă cu fosfatul din AMP)



2. $E\text{-}AMP + P\text{-}5'\text{-}DNA \rightleftharpoons E + AMP\text{-}(P)\text{-}5'\text{-}DNA.$



3. $DNA\text{-}3'\text{-}OH + AMP\text{-}(P)\text{-}5'\text{-}DNA \rightleftharpoons DNA\text{-}3'\text{-}(P)\text{-}5'\text{-}DNA + AMP$



4. $PP_i + HOH \rightarrow 2P_i$

Forţa motrice a procesului de sudare a catenei e hidroliza pirofosfatului.

Recent s-a stabilit că sinteza DNA se cuplează cu desfăşurarea DNA parental. Localizarea acestui proces e denumită *furcă de replicaţie*. Ea începe într-un loc anumit cu extinderea la aceeaşi viteză în ambele direcţii (fig. 2.14).

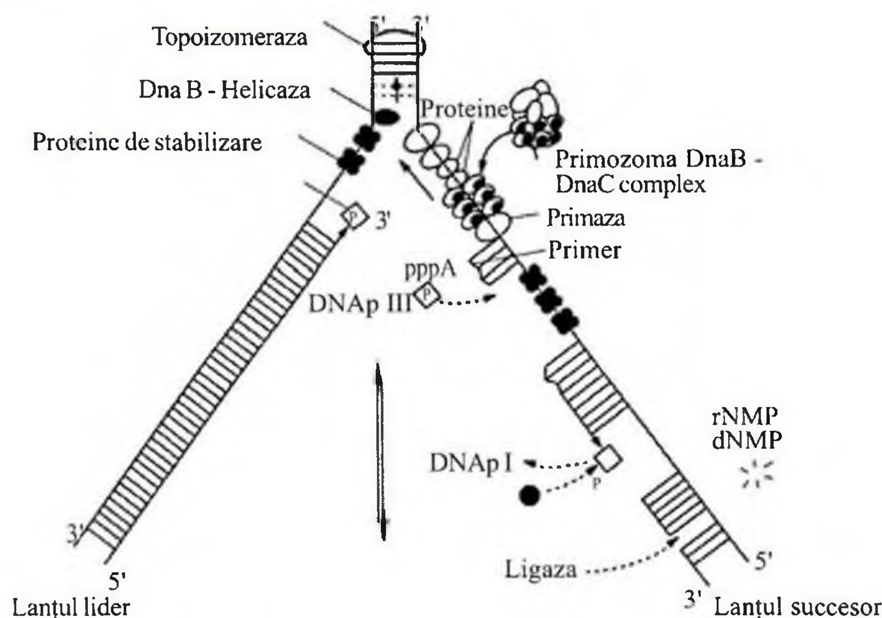
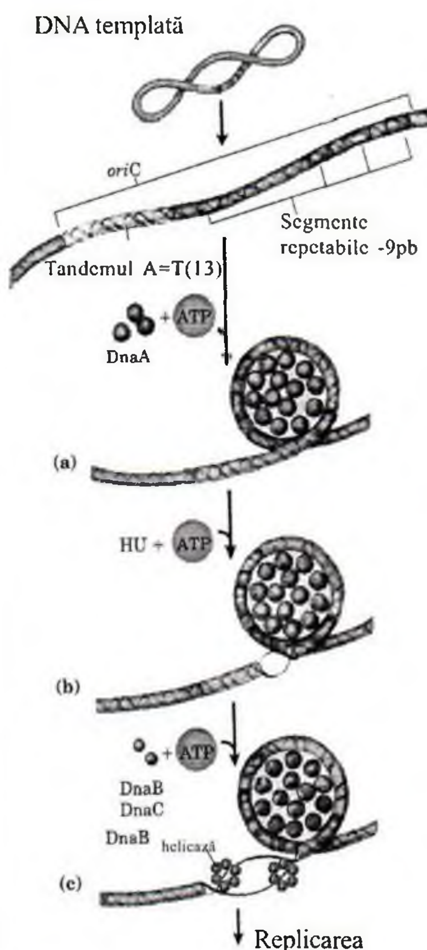


Figura 2.14. ***Imaginea schematică a proceselor fermentative în regiunea bifurcaţiei***



Enzima *helicaza* (Dna B), ce desfăşoară DNA, conduce la formarea superspirelor (torsiuni pozitive) într-o moleculă inelară. În regiunea furcii DNA parental se răsuceşte cu o viteză de 100 rotaţii pe secundă. Continuarea procesului de replicare implică lichidarea acestor structuri formate de rotaţie. *Topoizomeraza* (*DNA giraza*) efectuează rupturi monocatenare, apoi sudează legătura fosfodiesterică şi favorizează relaxarea structurii terţiare a DNA.

Iniţierea specifică a unui ciclu nou de replicaţie este determinată de complexul de proteine specifice (Dna A), aductor al complexului de proteină Dna B - Dna C la porţiunea anumită a genei, adică *punctul (origine) de replicaţie(OR)*. Timpul de iniţiere a replicaţiei este o valoare critică coordonată cu mitoza celulei. Proteinele Dna B se deplasează pe DNA, utilizînd energia hidrolitică a ATP. Enzima serveşte drept semnal pentru activarea primazei. În fig. 2.14a este redată iniţierea replicaţiei la *E.coli*.

S-a stabilit că DNA polimeraza nu e capabilă să iniţieze sinteza catenei. Ea are nevoie de un fragment cu grupă liberă 3'-OH. Acest fragment este sintetizat de *primază* (Dna G - proteina) - un fragment complementar cuplat la DNA

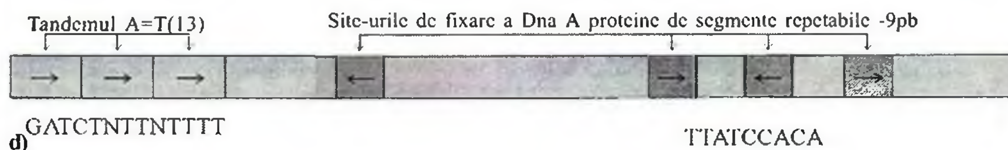
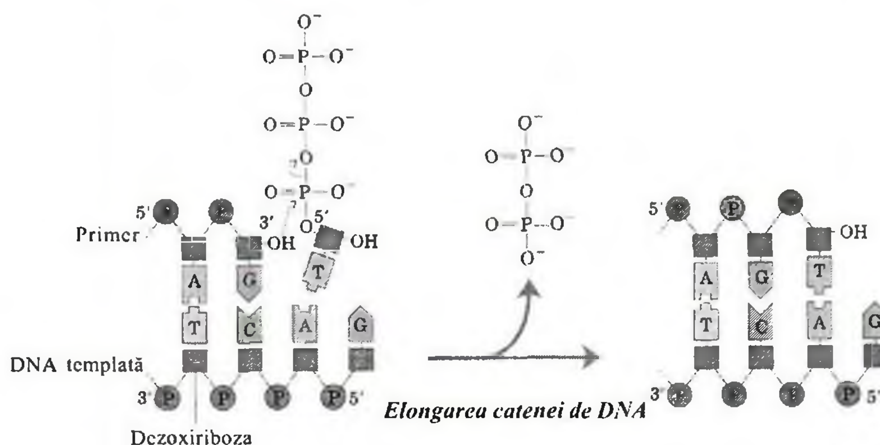


Figura 2.14a. ***Iniţierea replicaţiei (model) la E.coli:***
a) Aproximativ 20 molecule proteice Dna A legate cu ATP se fixează de cele 4 segmente repetabile ce conţin 9 perechi de baze. DNA se ataşează la acest complex.
b) Tandemul compus din cele 3 segmente A=T (13) cu baze repetabile este denaturat secvenţial.
c) Hexamerul DnaB proteine se asociază cu proteinele DnaC. DnaB helicaza pregăteşte despiralizarea DNA pentru sinteza primerului in replicare.
d) Aranjamentul secvenţelor în crearea furcii replicative ori C.

matrice. Primaza nu solicită iniţiator al sintezei. DNAp supraveghează fragmentul sintetizat de primază şi înlătură toate nucleotidele necomplementare (activitatea exonucleazică 3' ⟶ 5'), posedînd funcţia de autocorecţie, numai după care începe procesul de sinteză catalizat de un complex multienzimatic (holoenzimă). Grupa 3'-OH a ribonucleozidului e un iniţiator al sintezei DNA.

Cum se produce elongarea? Se declanşează un atac nucleofil al capătului 3'-OH pe atomul de fosfor (P), în apropierea ribozei din dRNTP ulterioară. Se formează o legătură fosfodiesterică şi se eliberează pirofosfatul-hidroliza, căruia determină polimerizarea propriu-zisă. Elongarea se produce în direcţia 5' → 3'.



Fenomenul e procesiv, adică enzima adiţionează multe nucleotide, fiind legată şi dirijată de matrice. Catenele DNA parental nu sunt paralele, adică orientarea sintezei pentru o catenă e 5' → 3', iar pentru alta - 3' → 5'. Toate DNA cunoscute pînă la moment sintetizează numai în direcţia 5' → 3'. Cum are loc sinteza celorlalte catene?

R.Okazaki, renumit savant japonez, a determinat că o bună parte a acestei catene se prezintă sub forma unor segmente de nucleotide (100-200 la eucariote şi 1000-2000 la procariote) (fig.2.15).

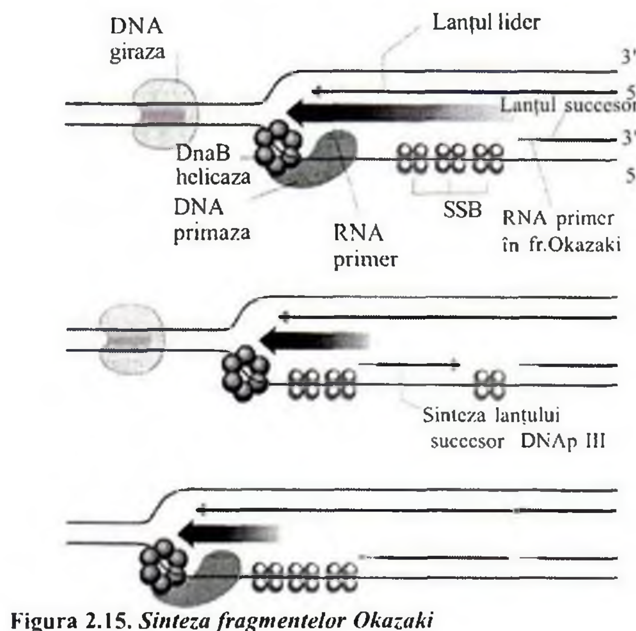


Figura 2.15. ***Sinteza fragmentelor Okazaki***

Persistenţa lor e fragmentară, de scurtă durată şi se apropie efectiv de bifurcaţie.

O dată cu avansarea bifurcaţiei, fragmentele se leagă covalent cu ajutorul DNA-ligazei şi se formează catena fiică, catena în care polimerizarea fragmentelor în direcţia 5' → 3' se produce la nivel atomic, pe cînd la nivel general se extinde în direcţia

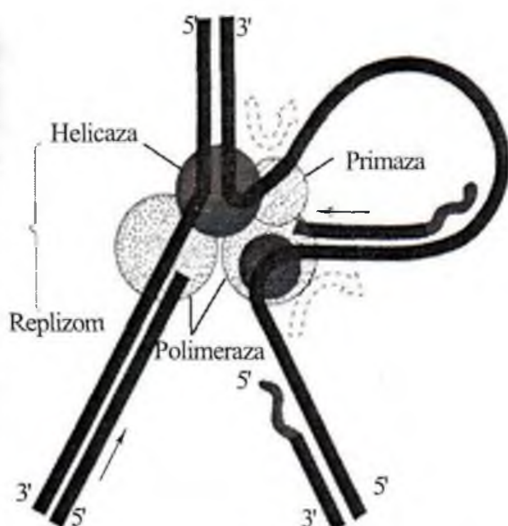


Figura 2.16. ***Modelul replicării în replizom, cu replicarea simultană a ambelor catene***

3' ⟶ 5'. Sinteza fiecărui *segment Okazaki* necesită primer; DNA polimeraza I sintetizează în continuare catena şi, avînd o acţiune exonucleazică, exclude primerele. În fine, fragmentele vor fi sudate de DNA ligaze, cu consum de ATP. Dar fiindcă replicarea e bidirecţională, pe cealaltă bifurcaţie a replicării procesul decurge identic. Datorită fidelităţii sporite, se menţine capitalul genetic al speciei (fig. 2.16).

Ce factori reclamă sinteza primerului? De ce DNAp nu sintetizează catena de novo? S-a stabilit că dacă enzima ar avea o anume capacitate rezultantă, ar fi incompatibilă cu fidelitatea înaltă a acestui proces. Pentru a forma o nouă legătură fosfodiesterică enzima controlează perfect geneza perechii de baze complementare. Funcţia de redactor permite reducerea greşelilor pînă la minimum. RNAp nu posedă o atare funcţie şi, eventual, apar falsuri de împerecheri. De aceea, se sintetizează un fragment de nucleotide cu o fidelitate joasă, dar numai temporar, DNAp le controlează şi exclude greşelile (o eroare la 10^{9-10} perechi de baze). Se cunoaşte că sistemele enzimatice autocorectoare nu pot iniţia sinteza de novo şi toate enzimele care iniţiază o astfel de sinteză nu sunt capabile de autocontrol şi, în felul acesta, creşte mult numărul de mutaţii.

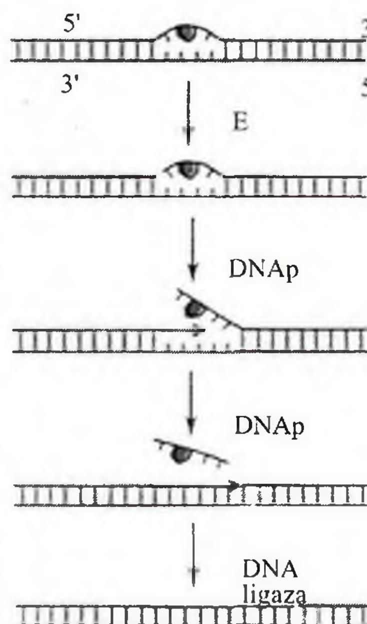


Figura 2.17. ***Repararea fragmentului de DNA***

Repararea DNA. Totuşi, o mulţime de reagenţi chimici şi fizici provoacă lezări structurale în DNA. Celulele posedă *mecanisme specifice de reparare*. Multe modificări pot fi reparate datorită faptului că informaţia genetică se conţine în ambele catene şi poate fi păstrată în secvenţa de nucleotide, dată fiind funcţionarea unui ansamblu de *enzime de reparaţie* care controlează DNA şi-l repară. Procesul decurge conform fig. 2.17.

1. Una dintre metodele de reparaţie o constituie excluderea dimerului de pirimidină, care apare sub influenţa razelor ultraviolete:

a) *Endonucleozidazele specifice* (E) taie catena şi fragmentul iese din helix.

b) DNAp (I) repară, concomitent sintetizînd normal catena. Ca primer serveşte 3'-OH liber al lanţului întrerupt, iar ca matrice se utilizează catena

complementară.

c) Dimerul este exclus sub acțiunea exonucleazică a DNAp.

d) Sudarea o execută DNA-ligaza.

Menționăm maladia *xeroderma pigmentosum* în care pielea e deosebit de sensibilă la razele soarelui, la ultraviolet. Epiteliul devine uscat, se atrofiază, apare cheratoza, sunt afectați ochii. În consecință, apare cancerul pielii, bolnavii mor de timpuriu.

Studiind fibroblaștii pielii, s-a constatat că la acești bolnavi nu sunt excluși dimerii pirimidinici. Faptul se explică prin lipsa activării endonucleazei ce hidrolizează catena de DNA în preajma dimerului.

Dimerul poate fi scindat și fotochimic. Toate celulele conțin enzima fotoreagentă, care-l identifică și-l scindează, utilizînd energia luminii (DNA fotoliaza).

Fluctuațiile termice dezordonate ale moleculelor din celule pot modifica mult starea genelor. DNA al fiecărei celule în 24 ore pierde 5000 de resturi de purină (apurinizare), 100 de citozine își pierd grupa NH_2 (pag.142). Dimerul de timină (legăturile covalente între 2T) deja a fost descris. *Cum se menține stabilitatea genelor?*

1. În mod analog, cu excluderea dimerului de timină. Alte modificări vor fi excluse datorită funcționării diverselor nucleaze de reparație.

2. *DNA — glucozidazele* (peste 20) exclud bazele modificate. S-au depistat multe enzime (circa 50), ce repar DNA modificat. Care-i cauza că DNA posedă timina, dar nu uracilul cu toate că ambele baze se împerechează cu adenina. De ce uracilul metilat se identifică numai în DNA? Cert e că metilarea utilizează multă energie. S-a stabilit că citozina în DNA spontan se dezaminează, formînd uracil (proces mutagen).

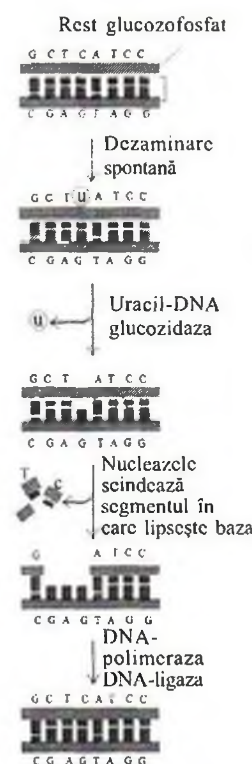


Figura 2.18. ***Uracilul din DNA este excis și înlocuit cu baza primară - citozina***

Mutația apărută se repară sub acțiunea sistemului de reparație, care identifică uracilul străin (fig. 2.18).

1. *Uracil-DNA — glucozidaza* — hidrolizează legătura glucozidică a uracilului cu dezoxiriboza (baza este eliminată).

2. *Endonucleaza specifică* identifică defectul și scindează scheletul în preajma bazei în lipsa ei.

3. DNAp sintetizează catena — include citozina complementară guaninei în catena intactă.

4. DNA-ligaza sudează catena nou-sintetizată.

Prima enzimă uracil-DNA — glucozidaza — nu exclude timina, fiindcă grupa CH_3 e indicele diferențierii de citozina dezaminată. Dacă n-ar fi acel CH_3, uracilul adecvat nu s-ar deosebi de cel format din citozină și defectul ar rămîne neobservat, conducînd la o mutație.

Sistemul de reparație solicită un astfel de uracil apărut (mutagen) și lasă intactă timina, inhibînd mutațiile. Se consideră că timina se utilizează pentru amplificarea exactității informației genetice. RNA nu se repară și utilizează uracilul ca bloc de construcție mai ieftin.

Particularitățile biosintezei DNA la eucariote

Replicarea DNA la eucariote se desfășoară după un mecanism asemănător cu cel de la procariote, prezentînd unele particularități:

1. Replicarea la eucariote este la fel semiconservativă.

2. Complexitatea organizării materialului cromozomial la eucariote face ca fragmentele Okazaki să fie mult mai scurte (150-200 nucleotide), față de procariote (1000-2000 nucleotide).

3. Tot datorită nucleozomilor, furca de replicare se deplasează mai lent la eucariote față de procariote; la eucariote se adaugă lanțul de DNA 3.000 nucleotide/min, iar la procariote 16.000 nucleotide /min.

4. Datorită mărimii moleculei de DNA, la eucariote există mai multe FR, de unde sinteza începe simultan (~100). Dacă ar exista o singură origine de replicare, sinteza DNA pe un cromozom ar necesita circa 800 ore; dar întreaga replicare se desfășoară în faza S a ciclului celular, deci în 8-10 ore, ceea ce se explică prin începerea replicării simultan, în mai multe puncte de replicare.

5. Originea furcilor de replicare nu este întîmplătoare de-a lungul unui cromozom; ele sunt grupate într-o anumită zonă a cromozomului, alcătuind o unitate de replicare sau replizom.

6. La eucariote DNA-polimerazele sunt de asemenea de mai multe feluri: α, β, γ, δ.

- DNA-polimeraza α este implicată în replicarea DNA nuclear. Este o proteină oligomeră alcătuită din patru subunități și se pare că este responsabilă de sinteza lanțului succesor.

- DNA-polimeraza β are mai degrabă un rol reparatoriu datorat acțiunii sale exonucleazice 5' $\rightarrow$ 3'.

- DNA-polimeraza γ este implicată în replicarea DNA mitocondrial.

- DNA-polimeraza δ este răspunzătoare de sinteza lanțului conducător, manifestînd și o activitate 3' $\rightarrow$ 5' exonucleazică; este asociată cu o proteină numită antigen nuclear, care-i stimulează activitatea.

7. Biosinteza DNA are loc numai în faza S a ciclului celular, separată de mitoză prin fazele de gol sintetic G_1 și G_2. În cursul acestei faze DNA nuclear este replicat în întregime și o singură dată per ciclu celular; respectarea acestui imperativ este posibilă datorită unor procese de metilare, care marchează covalent molecula de DNA ce a trecut prin experiența replicării. Metilarea se realizează la citozină, formînd 5-metil-citozină și are loc sub acțiunea unor metilaze care folosesc S-adenozilmetionina ca donatoare de grupări metil. Secvența recunoscută de metilare este: 5'-CG-3'

3'-GC-5'

La eucariotele superioare un număr restrîns de celule se divizează activ; cele mai multe sunt reținute în faza G_0 de nondiviziune. Decizia intrării din faza G_0 în G_1 și apoi S

este luată de proteine cu activitate kinazică, activare prin interacţiunea cu diverse cicline, a căror concentraţie suferă modificări profunde de-a lungul ciclului celular.

8. Ritmul sintezei de histone este similar celui de sinteză a DNA -ului; în faza S a ciclului celular cantitatea de DNA şi histonele se dublează. Cele vechi rămîn în nucleozom pe una din celulele-fiice. Cele noi sintetizate se unesc în nucleozom pe cealaltă catenă.

Telomeraza

Incontestabil, complexul replicativ se mişcă pe catenele antiparalele ale dublului helix, simultan în direcţii diferite. Sinteza unei catene-fiice este continuă, iar cealaltă se sintetizează sub forma fragmentelor Okazaki, care sunt reparate prin excizie, completate cu dezoxiribonucleotide şi apoi cusute de DNA-ligază. DNAp pot adăuga nucleotide numai la capătul 3' al catenei crescînde, fiindcă nu există enzime pentru elongarea nucleotidelor la cap 5'.

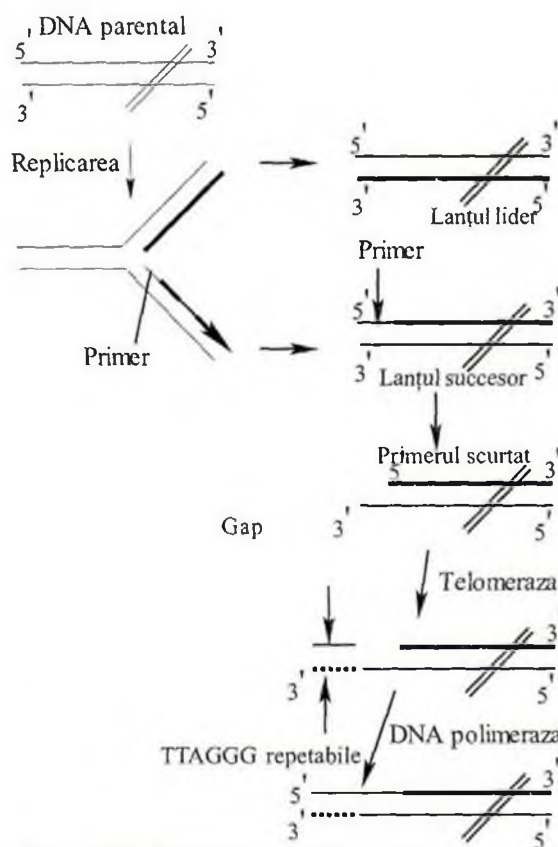


Figura 2.19. ***Rolul telomerazei în menţinerea structurii DNA***

Ultima din RNA primer nu poate fi completată ca replică de DNA, dat fiind că eventual nu există ceva ce necesită prelungire. De aceea, capătul 3' al catenei-sens din DNA parental este nereplicat, iar capătul 5' al catenei antisens-fiică de DNA este mai scurt şi, deci, capătul 3' al catenei-sens parentale este necuplat (fig. 2.19).

Savantul A.Olovnicov (1971) a sugerat ideea că, potenţial, există un mecanism biologic specific, ce prevede efectul dat. Se presupune, de altfel, că acest posibil mecanism e activ în celulele sexuale, cancerigene şi în celulele organismelor ce se înmulţesc vegetativ. Nu este activ mecanismul în majoritatea altor cazuri şi, în particular, în majoritatea celulelor somatice.

Studiile au confirmat, mult mai tîrziu, prezenţa enzimei ce compensează scurtarea DNA în majoritatea celulelor enumerate şi ea a fost numită *telomerază — transferază terminală* a telomerei.

Funcţia constă în creşterea unui hexanucleotid repetabil multiplu (TTAGGG) la capetele DNA nuclear, ce formează aşa-numita telomeră la om. În final, nu se pierde mesajul genetic şi nu e dereglat mecanismul de descifrare a lui. Aşadar, problema azi constă în replicarea incompletă a catenei întrerupte de DNA, însă dacă cromozomul

dispune la capătul 3' de proeminență unicatenară *overheng*, apoi are loc o replicare incompletă și a catenei lider.

Telomeraza prezintă o enzimă-ribonucleoproteid compusă din RNA și proteină. Ea compensează marginalitatea replicării obișnuite, utilizînd dezoxiribonucleotide și ca matrice o parte din succesiunea RNA, subunitate a telomerazei. Enzima posedă funcție de transcriptază inversă celulară — revers transcriptaza.

Telomeraza protejează cromozomul de degradare și preîntîmpină alipirea cromozomilor între ei. E știut că DNA-polimeraza e capabilă să sintetizeze în direcția 5' ⟶ 3', utilizînd RNA-primer ca inițiator, apoi, după înlăturarea lui, capătul 5'-terminal al replicii rămîne nereplicat. Și, în consecință, la fiecare diviziune celulară cromozomii se micșorează. Aceste particularități ale replicării determină formarea conceptului că telomeraza posedă un mecanism specific deosebit, ce determină longevitatea celulei.

Studiul genelor ce codifică subunitățile RNA a favorizat aplicarea testelor genetice-cheie, ce au confirmat că RNA-telomerică dictează succesiunea nucleotidelor în telomerele cromozomiale *in vivo*.

Subunitatea proteică TRT (Telomerase Reverse Transcriptase) a fost depistată în organismele filogenetic neînrudite (de la unicelulare pînă la om), ce confirmă că poate fi universală pentru eucariote care posedă telomerază.

Unele proprietăți ale TRT nu diferă de cele ale cunoscutelor revers transcriptaze și funcționează în complexe ribonucleoproteice stabile. S-a stabilit că RT (revers transcriptaza) SID-ei poate fi transformată în enzima ce funcționează ca telomerază, preschimbînd simplu ionul Mn^{++} în Mg^{++}. În atare condiții RT (revers transcriptaza) rămîne în complex stabil cu matricea RNA și multiplu copie un fragment mic din lungimea sa. Aceste enzime posedă și unele particularități ce le deosebesc de RT cunoscute. Sunt mai mari, au domeniul N-terminal de bază și o distanță neobișnuit de mare între motivele A și B. Sunt modificări în resturile aminoacizilor în domeniile RT, care au caracter de conservatism vădit printre celelalte RT obișnuite.

Datele recente permit reprezentarea schemei construcției moleculare a TRT. Activitatea catalitică a telomerazei necesită numai 2 componente: RNA și proteina TRT. Un argument convingător este reconstrucția activității telomerazei din subunitățile recombinate izolate, purificate de RNA și TRT. Alte proteine sunt fixate de acest complex și pot avea un alt rol decît acel de participare la formarea centrului catalitic — iau parte la procesul de reglare a activității telomerazei.

Mecanismul elongării capetelor cromozomului este redat în figura 2.20. Se alungește capătul 3' al DNA, și datorită lui punctul extrem din replica 5' se mișcă spre dreapta. În continuare catena complementară se elonghează, cu implicarea DNA-polimerazei.

Mecanismul sintezei G-catenei de telomerază se studiază mult mai intens, decît acel al sintetizării catenei complementare C.

Există, posibil, 2 mecanisme de sinteză a catenei C.

a) Prin utilizarea catenei G ca primer, formînd bucle:



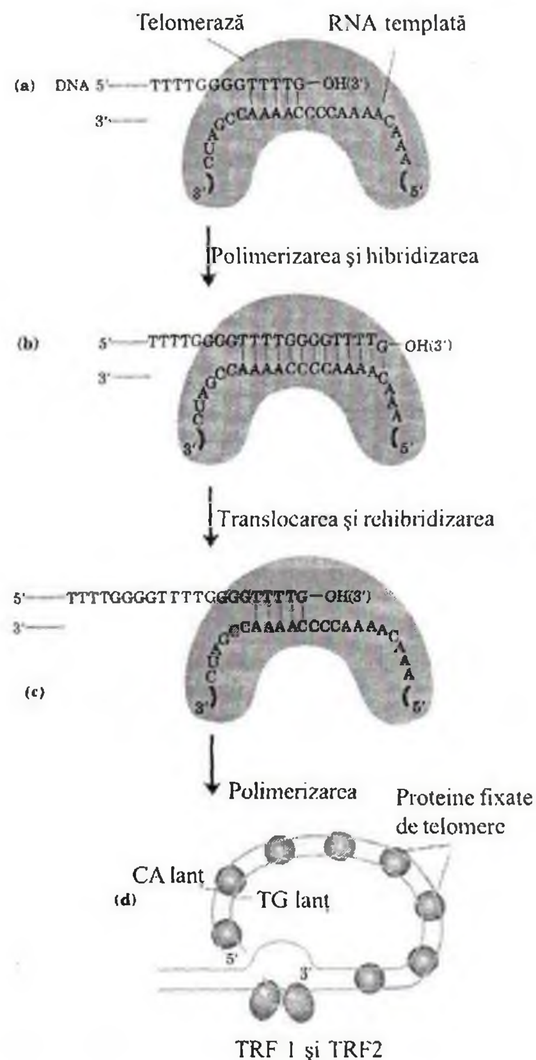


Figura 2.20. *Mecanismul elongării capetelor cromozomiale*

Bucla este un substrat nefavorabil pentru DNAp care nu poate forma perechi Watson-Crick; proteinele nu sunt capabile să se fixeze de orice structuri.

b) E mai verosimil mecanismul standard de iniţiere a sintezei, cu participarea enzimelor care iau parte la sinteza catenei întrerupte: primaza, DNA polimeraza în complex cu proteinele corespunzătoare:



Analiza telomerelor din diferite organisme denotă că sinteza C-catenei a DNA-telomerice are loc la fel ca şi la o replicare bidirecţională a DNA sau, în alte cazuri, fiind rezultatul unei reacţii de "completare", care substituie fragmentele G-repetabile unicatenare în DNA bicatenară telomerică. Asemenea reacţii de "înlocuire" sunt necesare în foarte multe cazuri de determinare a lungimii telomerei. C-catena joacă un rol activ în determinarea numarului de repetări pe care telomeraza le poate adăuga la capătul DNA. Replicarea telomerei se află sub un control complex, implicînd şi nucleaze.

S-a confirmat, la mijlocul anilor 1990, că telomeraza ce compensează tăierea cromozomilor este o enzimă caracteristică pentru celulele cancerigene. În aceste celule cancerigene telomera este scurtă şi stabilă, iar activitatea telomerazei este foarte intensă. Totodată, activitatea telomerazei nu e detectată în celulele somatice la om, unde DNA telomerică lungă la naştere (12-15 mii de nucleotide) se scurtează cu vîrsta, conform ipotezei expuse.

E studiată suficient telomeraza la Tetrahymena thermophila care conţine peste 40000 telomere la o celulă. Această enzimă e depistată şi caracterizată, utilizînd metoda directă, precum şi reacţia polimerazică în lanţ.

Caracteristica fermentativă a telomerazelor (TM):

a) *In vitro TM sunt neprocesive*, adică alungesc cromozomul numai o singură dată, cu o telomeră repetabilă.

Telomeraza la om e un ferment inalt procesiv, ce alungeşte DNA-primer la sute de repetări. Procesivitatea e dependentă de anumite condiţii. S-a stabilit că dacă primerul are o lungime mai mică decît 10 nucleotide, el se alungeşte o singură dată. Procesul poate fi intensificat, dacă se adaugă din abundenţă oligonucleotide. Dacă primerul are mai mult de 10 nucleotide, procesul devine procesiv şi DNA poate conţine mii de nucleotide.

Se presupune că în telomerază, pe lîngă fragmentul-matrice al RNA, e prezent şi un alt fragment de fixare "ancoră"- site. E posibil că primerii majori se fixează de acest fragment, ceea ce evită disocierea produsului şi-i permite telomerazei să funcţioneze procesiv. Există modele schematice referitoare la acest proces.

b) *Specificitatea de substrat* — elongaţia primerilor netelomerici — are loc la o concentraţie de Mg^{++} nu mai puţin de 1,25 mM şi în lipsa de K^{+} şi Na^{+}. Primar e alungit capătul 3' cu blocul dGGGGT. Eficacitatea e dependentă de structura primară atît 5', cît şi 3' a oligonucleotidelor. Telomeraza cu aceeaşi eficacitate utilizează în catena polinucleotidică dezoxi, precum şi didezoxiribonucleotid trifosfaţi. În ultimul caz are loc finalizarea sintezei DNA.

În calitate de substrat se utilizează rGTP şi rTTP, procesul e procesiv la concentraţii de 10-100 mkM de rTR. Pot fi utilizaţi şi primere DNA-RNA. Ca substrat, însă, mai convenabil din punct de vedere termodinamic este duplexul RNA-RNA.

Cele descrise, precum şi datele de secvenţă aminoacidică în proteina telomerazica p95, confirmă că evolutiv telomerazele au provenit din RNA — polimeraze RNA-dependente.

c) *Activitate exonucleazică* îi permite să hidrolizeze atît primerile, cît şi produsele sintezei fermentative. Ea înlătură toate resturile nucleotidice netelomerice şi începe sinteza DNA întotdeauna cu dG (la procariote, la eucariote date deocamdată lipsesc). Care-i sensul acestei activităţi? Activitatea de corecţie determină o sinteză corectă, aseamănătoare cu RNAp DNA — dependentă.

Structura şi funcţia RNA telomerazice. Sinteza la om a acestei subunităţi e determinată de RNAp III, la eucariotele primare — de RNAp II. Conservatismul în structura RNA e foarte mic, chiar şi la organismele înrudite.

Structura primară diferă nu numai în succesiunea nucleotidelor, dar şi în lungimea lor, care se măreşte spre eucariote.

La majoritatea RNA telomerice regiunea matriceală se află la o depărtare de 50 nucleotide de la capătul 5'. Omologia e foarte mică şi la genele RNA telometrazice — coincidenţa la om şi şoarece este de 65%.

Structura secundară e bine studiată la *tetrahimene*: e compusă din 4 bucle şi un fragment unicatenar, ce conţine matrice pentru sinteza DNA telomerice. Unele sunt regiuni conservative, altele formează unghiuri una faţă de alta (60^{o}), motive ce ar fi recunoscute de proteinele telomerazice. Se presupune şi prezenţa centrului fermentativ (fig. 2.21).

Un component al centrului activ este regiunea matriceală a RNA telomerazice. Orice

modificare în această secvență a RNA telomerazică conduce la modificări complementare în structura primară a telomerei.

Aceste schimbări (mutații) nu modifică activitatea telomerazei, dar modifică telomera, cu consecințele respective — o îmbătrînire precoce sau moartea celulei. Dacă unele mutații se manifestă imediat, apoi altele acționează ca o bombă genetică, ce va apărea după 600 replicații, conducînd la o creștere necontrolată.

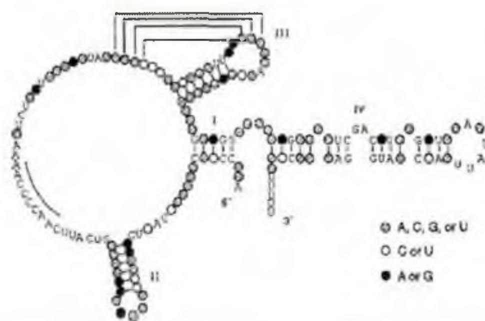


Figura 2.21. *Structura secundară a RNA telomerazice la tetrahimene*

E clar că, pe lîngă funcția sa de matrice pentru sinteza DNA telomerazică, RNA telomerazică ia parte la funcția catalitică a telomerazei.

A fost realizată reconstrucția activității telomerazei și la om. S-a stabilit că fragmentul funcțional e între 1-203 resturi; fragmentul 1- 44 spre 5' terminal nu e esențial pentru activitatea fermentativă, iar mutațiile între 170 -199 complet inactivează enzima. Posibil că această regiune interacționează cu proteinele telomerazice.

Proteinele complexului telomerazic.

Spirala dublă de DNA telomerică umana este fixată de proteina TRFl, care modifică conformația DNA, formînd o superspirală, în care o rotație e formată din sute de perechi de baze. S-a constatat recent că o altă proteină --TRF2, ce se leagă la capătul 5'-terminal al catenei C, fixează telomera la «bază» (trunchi), cu formarea unei bucle telomerice gigantă (t-buclă) comparabilă cu dimensiunile telomerei (fig.2.22).

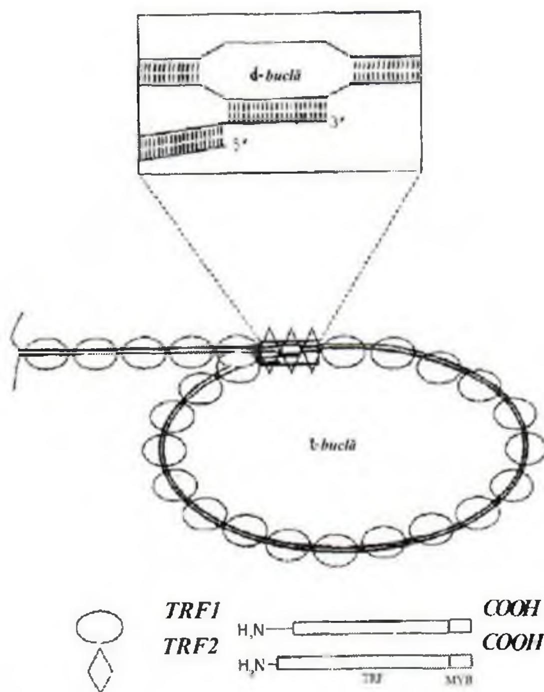


Figura 2.22. *Modelul schematic al buclelor telomerice și structura domenică a proteinelor telomerice TRF1 și TRF2. Structura domenică a proteinelor telomerice TRF1 și TRF2*

Structura domenică a TRF1 e redată schematic în desen.

Ca proteina să interacționeze cu acidul nucleic este necesară oligomerizarea polipeptidelor pentru care și servește TRF domenul. Fiecare moleculă de TRF1 înfășoară DNA sub un unghi de 120°. Experimental s-a constatat că în prezența TRFl e facilitată circulația moleculei scurte de DNA, compusă din

segmente telomerice repetate, ce confirmă rolul proteinei în formarea structurii spațiale telomerice.

Proteina TRF2 după structură e asemănătoare cu TRFl, dar domenul final nu interacționează cu domeniile omoloage ale reprezentantei următoare din familia respectivă și deci ambele proteine în moleculă pot exista în formă de homodimeri. TRF2, ca și TRF1, în consecința splaisingului alternativ formează două variante.

S-a constatat că TRF2 se atașează în regiunea contactului telomeric cu baza (desenul). Buclele telomerice s-au depistat în cromozomii celulelor HeLa, în leucocitele periferice la om, în hepatocitele șoriceilor etc. Cele mai mici bucle conțin circa o mie de perechi de baze. Fixarea TRF2 la capătul cromozomului necesită un segment de DNA telomeric ce conține nu mai puțin de 6 nucleotide (TTAGGG). Cu cît mai multe sunt segmentele repetabile, cu atît procesul de fixare e mai favorizat. Se consideră că în acest loc DNA unicatenară-3', hibridizată cu porțiunea antiparalelă parțial desfășurată a spiralei duble «trunchi», formează așa - numita bucla-d (displacement loop).

Consecințele fenotipice în modificările activității proteinelor TRF. Lungimea telomerelor este asociată cu vîrsta celulelor fenotipice. In celulele somatice, grație lipsei telomerazei sau a altor cauze, numărul segmentelor repetate telomerice se micșorează la fiecare diviziune celulară. La fibroblaști in vitro, dublarea numărului de celule duce la micșorarea telomerei cu 48-21 perechi nucleotidice. In vivo, la fibroblaștii umani valoarea e de 75 perechi la o mitoză. Telomera celulelor sanguine periferice la copii pierde mai mult de 1000 perechi nucleotidice în an . Se consideră că între 4 și 20 ani telomerele se micșorează mai încet, dar la vîrstă matură și senilă se micșorează cu o viteză constantă de 30-60 perechi nucleotide anual.

Cu vîrsta, telomerele ating o lungime critică, la fibroblaștii omului circa 5-7 mii perechi, la care apare o îmbătrînire replicativă și în consecința — inhibiția și stoparea proliferației. Expresia artificială a telomerazei preîntîmpină îmbătrînirea și e posibil de imortalizat celulele respective, ce întîlnim în celulele cancerigene. În ultimele inhibînd telomeraza, e posibil stoparea răspîndirii celulelor.

S-a constatat că expresia proteinei TRF1 în cultura celulară duce la o mitoză prematură și moartea celulelor. Reglarea expresiei permite celulelor să supraviețuiască, dar după cîteva cicluri celulare are loc micșorarea telomerelor. În condițiile de inhibare a sintezei TRFl în celule, ce expresează telomeraza, are loc o creștere lentă a lungimii telomerelor. Posibil, TRFl favorizează formarea t-buclei, împiedicînd creșterea telomerelor din contul activității telomerazice. S-a arătat că TRF1 in vitro inhibibă lungirea catenei C - telomerice.

Inhibiția proteinei TRF2 conduce la o stopare imediată și ireversibilă a proliferației. La modificări morfologice în celulele, caracteristice îmbătrînirii și inducției markerilor celulari ai procesului, cromozomii formează structuri inelare, neperzînd segmentele telomerice. În telomerele nemodificate dispar segmentele unicatenare, fără modificări în activitatea telomerazei.

Se confirmă că nu telomera apară cromozomul de nucleaze, de adiție și ruperi în mitoză - asta-i funcția proteinei TRF2.

Creșterea concentrației de TRF2 în cultura de fibroblaști conduce la majorarea vitezei de micșorare a telomerelor în procesul de îmbătrînire. Efectul nu duce la o îmbătrînire precoce — celulele continuă să prolifereze. Dacă numărul limită la o îmbătrînire e de

6-7 mii perechi nucleotide la celule în control, apoi la cele care expresează mai mult TRF2 această limită e de 2-2,7 mii de perechi mai mică, ce permite ca ele să se divizeze de 15 ori mai mult pînă la îmbătrînire. De altfel, sunt preîntîmpinate alipirea şi ruperea cromozomilor.

Se consideră că nu lungimea telomerei e cardinală pentru inducerea îmbătrînirii celulare, ci starea lor, determinată de funcţia protectoare a proteinei TRF2.

Experimental s-a demonstrat că inhibiţia TRF2 nu numai că conduce la modificări fenotipice caracteristice îmbătrînirii, dar şi provoacă modificări genetice: alipirea cromozomilor, activarea p53, creşterea concentraţiei p16, micşorarea nivelului ciclinei A şi hipofosforilarea pRb. Inactivarea simultană a p53 şi pRb preîntîmpină îmbătrînirea celulelor experimentale, determinată de inhibiţia TRF2. Proteina p53 are o afinitate majoră faţa de segmentul unicatenar al telomerei, către locul de fixare a t-buclei şi favorizează formarea ei în prezenţa TRF2.

Reglatorii naturali ai proteinelor TRF umane.

Efectul TRF2 asupra telomerei e stabilit cert în condiţii de experiment, dar modulatorii proteinei nu sunt încă identificaţi. A fost identificată *proteina hRapl*, care are influenţă, fiind fixată pe telomere, dar ea poate interacţiona şi cu alte porţiuni ale cromozomului. Proteina TRF1 uşor modifică lungimea telomerei, fiind reglată in vivo diferit.

Proteina TRF1 poate fi poli-ADP-ribozilată, cu disocierea consecutivă de la DNA. O aşa modificaţie spaţială e catalizată de *tankirază* (poli-ADP-ribozil-polimerază ankirată de telomeră). Proteina (K.F.2.4.2.30) e partener al TRF1, care pătrunde în nucleu şi în forma sa neactivă e fixată de proteina telomerică. După activare, tankirază poli-ADP ribozilează pe sine, cît şi pe TRF1, ce conduce la disocierea complexului nucleoprotidic şi eliberarea telomerelor. Ultimele sunt disponibile pentru acţiunea telomerazelor şi a altor enzime. Tankirază se consideră reglator pozitiv al telomerazei.

La om şi la vertebrate sunt depistate două izoforme ale *tankirazei TNKS (1) şi TNKL (2)* cu masa moleculară, respectiv, de 142 şi 127 kDa. Tankirază posedă un domen enzimatic, alt domen fixat (ankorat) compus din 24 repetări şi al treilea domen-SAM; ultimele participă în interacţiuni proteo-proteice. Tankirază 1, spre deosebire de tankirază 2, posedă şi un domen suplimentar - N-terminal domen, care deocamdată nu-i asociat cu nici o funcţie. Nu are localizaţie nucleară şi majoritatea enzimei se găseşte în citozol, unde este supusă fosforilării şi activării de MAP-kinaza. Nu e clar dacă enzima activă este transferată în nucleu sau pulul nuclear al tankirazei este activat de MAP-kinază (proteinkinază, activată de mutageni).

Ultima poate fi translocată în nucleu. MAP-kinaza este reglată de insulină şi factorii de creştere şi se consideră că graţie tankirazei organismul menţine telomerele celulelor sub controlul hormonal.

A fost depistată o altă proteină telomerică, ce interacţionează cu TRF1 numită TINF2 (TRF-1-interacting nuclear factor 2) cu o masă moleculară aproximativ de 40 kDa.

Structural e asemănătoare cu proteinele TRF, avînd la capătul C-terminal un domen fixator de DNA de tipul Myb. Acest factor favorizează scurtarea telomerei şi negativ reglează activitatea telomerazei, intermediind efectul TRF1. Mecanismul de acţiune a TRF1 constă nu numai în superspiralizarea DNA şi favorizarea formării buclei t. Graţie interacţiunii cu diferite şi multiple proteine TRF1, le poate concentra în apropierea telomerelor. Ea poate

fixa proteina PinX1-inhibitor, puternic al telomerazei, care acționează direct asupra enzimei, spre deosebire de alți modulatori, care vizează disponibilitatea telomerelor.

Recent, s-a depistat o alta proteină telomerică - Pot1, ce se fixează de segmentul unicatenar. Posibil, funcția proteinei respective constă în protejarea acestui fragment de efectul nucleazelor, agenților chimici, radiației. Pot 1 (Protection Of Telomeres) — un polipeptid de 71 kDa, interacționează cu TRF1. Acționînd asupra procesului de fixare a Pot1, proteina TRF1, concentrația căreia este proporțională cu lungimea telomerei, transmite la capetele unicatenare informația despre mărimea totală a DNA telomerice. Toate proteinele cunoscute și necunoscute ale complexului nucleoprotidic formează *telozoma*.

E de constatat că numai unele proteine telomerice au omologie la alte eucariote. În organismele model nu au fost depistate toate proteinele cunoscute în genomul uman. Evoluția a parcurs altă cale, dar studiind, se poate obține informație utilizantă.

Telomera si sistemul reparativ

Radiația ionizantă și alți factori nocivi provoacă rupturi în DNA bicatenar - DSB (Double Strand Break). De altfel, transformările în DSB sunt considerate ca metodă de reinițiere a furcilor replicative lezate, ce preîntîmpină dublarea normală a cromozomilor în faza S. Deosebim 2 căi concurente de reparație a DSB: 1) împerecherea cromozomilor omologi, recombinarea și resinteza catenelor scurte; 2) legarea neomologică a capetelor DNA (NHEJ - Non-Homologous End Joining). Se consideră că prima cale predomină în fazele S și G_2 ale ciclului celular și la celulele ce se înmulțesc activ (drojdiile), a doua — în fazele G_0, si G_1 și la celulele ce se divizează rar (fig.2.23).

Capetele telomerei, dacă nu sunt protejate de t-buclă, sunt identice cu DSB și trebuie să fie reparate fie prin formarea cromozomilor inelari sau a cromozomilor cu două sau mai multe centromere, după mecanismul NHEJ. Ultima se observă în celulele cu telomere scurte la limită. Indiferent de mecanismele reparative atît DSB, cît și telomerele neprotejate activează proteinkinaza ATM, ce succede în activarea p53 și la blocarea proliferației, inducției mecanismelor celulare ale îmbătrînirii și apoptoza. Cînd însă se formează bucla-t, segmentul unicatenar telomeric se împerechează cu «trunchiul», imitînd recombinația și în anumite condiții stimulează reconstrucția catenei DNA.

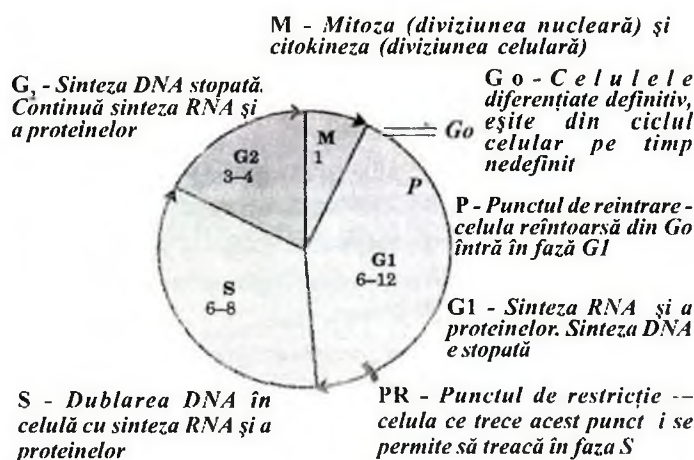


Figura 2.23. *Ciclul celular la eucariote (în ore)*

În componența complexului nucleoproteidic la om, ca şi la drojdii, e prezentă permanent proteina Ku - o componentă a căii NHEJ. E compusă din două subunități diferite cu masa moleculară de 69 şi 83 kDa (Ku 70 şi Ku 80). Depistat în anii 80 ca autoantigen, la care, la unii bolnavi cu maladii autoimune, se formează anticorpi utilizați în donare. Proteina leagă rupturile în DNA nu numai în zona telomerică, dar şi în orice altă consecutivitate cu fisuri uni- sau bicatenare şi posibil preîntîmpină degradarea acizilor nucleici. Isuficiența proteinei Ku duce la generarea unor compuşi cu erori (deleția) multiple.

La mamifere, fixarea Ku pe DNA duce la formarea unei proteinkinaze-DNA dependente (DNA-PK) compusă din două subunități Ku şi a treia subunitate catalitică (DNA-PK_{CS}), activată grație fixării celor două. Participarea Ku în funcționarea telomerelor se studiază intens şi unele date confirmă că durata vieții şi simptomele precoce ale îmbătrînirii la şoricei sunt rezultatul inactivației genelor, ce codifică subunitățile Ku. Date analogice s-au înregistrat şi pe cultura celulelor de om. Rolul diferit în procesele de reparație a DSB şi în protejarea telomerei e explicabil, grație faptului că ambele sunt contrare după sens. Se consideră că Ku are numai funcție de protejare şi evaluarea proceselor e în dependență de proteine specifice fiecărui proces: fie TRF sau sistemele de reparație şi recombinație. După fixarea proteine Ku şi activării DNA-PK, în reparație participă multiple proteine. Printre ele şi complexul Rad 50/Mre 11/Nbsl. Aceste proteine sunt implicate atît în recombinații omologe cît şi în menținerea integrității telomerei.

Proteina Rad 50 (Radiation mutant 50) are omologie şi la om, după formă seamănă cu miozina. Are aceeaşi masă moleculară — 153 kDa. Polipeptidul are două domenii ce leagă DNA, aranjate la capetele N- şi C-terminale, care posedă activitate enzimatică ATP-azică. Identitatea aminoacidică e de 50%. Domeniile enzimatice sunt legate cu un segment superspiralizat, aranjat sub un unghi în Z-motiv în centrul moleculei. Domeniul-Zn de legătură serveşte pentru dimerizația Rad 50, ce va menține simultan moleculele de DNA, aranjate la o distanță de 1200Å.

Mre 11 (Meiotic recombination 11) este o nuclează, care-i prezentă atît în drojdii, cît şi în lumea animala şi om. In reparație, proteina degradează buclele şi alte structuri incorecte în molecula de DNA. Complexul Rad 50/Mre 11 posedă activitate atît endo-, cît şi exonucleazică în direcție 3' ⟶ 5'. Funcțiile acestei proteine nu sunt identice în reparație şi în menținerea structurii telomerice.

Al treilea component al complexului n-are omologie la drojdii şi la om. La om este *o proteină - nibrina* (Nbs 1 - Nijmegen breakage syndrome), mutația căreia la nivelul celular provoacă modificări asemănătoare cu mutația ATM (Ataxia-Telangiectasia Mutated), dar cu o clinică diferită. Ambele molecule (Nbs 1 şi ATM) iau parte la transmiterea semnalului în aceeaşi cale. Nbs 1 modulează activitatea enzimatică a Rad 50 şi Mre 11 şi-i transmite complexului capacitatea de a relaxa dublul helix de DNA în prezența ATP.

Informația despre mecanismele în funcționarea complexelor proteice este insuficientă, dar se poate, la moment, clasifica proteinele respective în următoarele grupe:

a) proteinele ce mențin structura spațială a telomerei (TRF);

b) proteine ce determină şi cauzează formarea heterocromatinei telomerice, modulează activitatea genelor, incluzindu-le în hetero-cromatină (Rap, Rif, Sir, acetilazele histonice, metiltransferazele);

c) proteine ce realizează repararea telomerelor distruse, posibil negativ reglează mărimea lor nucleazele (Rad 50/Mre 11/Nbs 1 şi Ku);

d) proteinele-semnale ce transmit informaţia despre starea telomerelor altor structuri (subcelulare) şi iniţiază îmbătrînirea celulară şi apoptoza (PK ATM, p53, pRb), şi altele ce reglează proliferarea şi moartea celulelor.

Îmbătrînirea moleculară şi dependentă de ea, regenerarea ţesuturilor sunt probleme, studiul cărora continuă intens. Sunt deocamdată cunoscute două tipuri de îmbătrînire rapidă patologică, mecanismele moleculare ale cărora fiind studiate. *Sindromul Verner* sau progeria bătrînilor determinat de mutaţia în gena helicazei (112), ce îngreuează replicarea DNA şi proliferarea celulelor. Bolnavii decedează de bătrîneţe la vîrsta de 35-50 ani. *Sindromul Hatcinson-Gilford* sau progeria dependentă de mutaţia *laminei A* (113), ce îngreuează proliferarea, ca consecinţa a disfuncţiei membranei celulare, înbătrînirea apare pînă la 20 de ani. In ambele cazuri anomaliile genetice duc la inhibiţia patologică a reînnoirii ţesuturilor, care nu este consecinţa scurtării telomerelor. Îmbătrînirea naturală e cauzată de istovirea limitei Hayflick - mărimea telomerei se apropie de limita 1-2 mii perechi nucleotide, necesare pentru formarea t-buclei. E posibil că mecanismul telomeric al îmbătrînirii e cauza schimbului natural al generaţiilor la om.

Sunt depistate proteine noi telomerice (studiu bazat pe omologie cu cele cunoscute); s-au stabilit şi genele ce le codifică. Spectrul funcţional al acestor proteine e foarte variat: reglează înmulţirea celulară, transcripţia genelor, semnalizarea celulară, transmembranară, modificaţia RNA-mesager, transportul vezicular, formarea complexelor multiproteice.

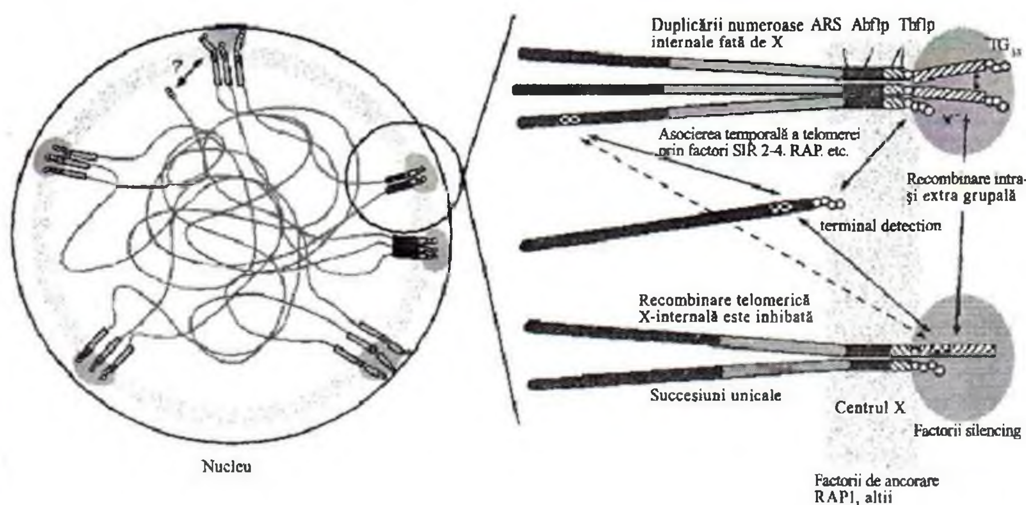


Figura 2.23a. *Schema arhitecturii nucleului*

Un număr limitat de organisme nu posedă activitate telomerazică şi menţin lungimea telomerei prin alte mecanisme: posibil, prin recombinarea sau transpoziţia unor fragmente mici – durata şi viteza transpoziţiei sunt strict controlate de celulă. Se presupune participarea telomerei, în afară de replicarea şi formarea "Chep", la organizarea nucleului şi a cromozomilor, segregaţia meiotică şi mitotică. Se atestă că poziţia telomerelor în nucleu e perfect specializată şi depinde de interacţiunea lor în membrana nucleului; au tendinţa de a forma claustru de partea nucleului, contrară cromocentrului (fig. 2.23a).

Telomerele interacţionează (claustre), formînd complexe poliproteice — direct sau indirect — printr-un component al membranei nucleare. O astfel de interacţiune, posibil şi cu matricea nucleară, are atribuţie la represia genelor.

Genele aranjate în vecinătate sau la capătul telomerei sunt expuse represiei transcripţionale nestabile — *efect telomeric de poziţie*. Ultimul e strîns legat de procesul excluderii genelor (silencers - inhibiţie) — proces transcripţional ce determină tipul de conjugare.

Silencers constă în formarea unei structuri cromatinice speciale de represie, cu participarea unor proteine specifice.

Reglarea telomerazei în celulele somatice normale. La anumite etape ale dezvoltării, şi unele celule specializate somatice posedă activitate telomerazică, care se reglează foarte fin şi precis. Ca reglatori pot servi unii factori de creştere.

Concluzii:

a) Nu s-a depistat activitatea telomerazei în celulele somatice normale diferenţiate terminal. De exemplu: fibroblaştii, fie că se găsesc în stare normală sau proliferativă. Deci, determinanta primară a activităţii telomerazice e originea celulei de anumit tip. Activitatea telomerazei integral e dependentă exclusiv de capacitatea celulelor la autorestabilire.

b) Al doilea factor ce influenţează asupra activităţii telomerazice e activitatea mitotică celulară. Activitatea telomerazei se evidenţiază în celulele mai primitive, bazale şi proliferative.

c) Activitatea telomerazei se reglează în procesul ciclului celular. Un factor decisiv în reglarea activităţii telomerazice ar trebui să fie nivelul expresiei genelor proteinelor ce formează centrele catalitice ale telomerazei. Reglarea fină e dependentă şi de reglarea sintezei proteinelor asociate cu telomeraza şi genele RNA matriceale.

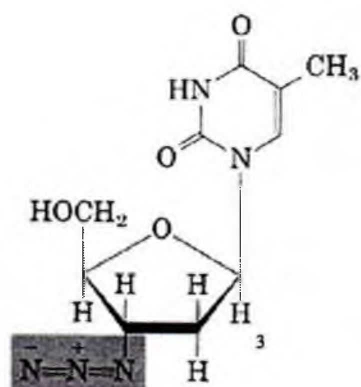
Activatorii şi inhibitorii telomerazei. *Reglarea sintezei DNA de diferite preparate* vezi fig.2.32.

După ce a fost determinată legătura între activitatea telomerazică şi oncogeneză, senilitate, se explorează două direcţii:

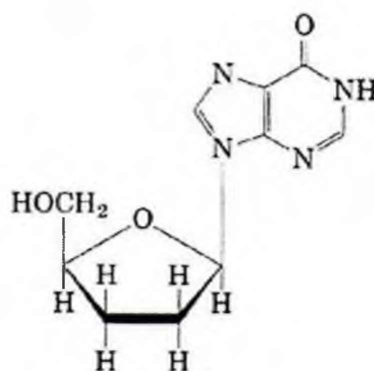
a) crearea DNA antisens faţă de telo-RNA şi

b) studierea inhibitorilor revers transcriptazelor.

Ca inhibitori servesc oligonucleotidele modificate, complementare regiunii-matrice a RNA-telo. Ele sunt rezistente la acţiunea proteinelor şi a nucleazelor. Atare nucleotide se fixeaza în mod specific de matricea RNA-telo a omului, efectiv inhibînd activitatea telomerazică *in vitro*. In vivo apare problema transportului inhibitorilor prin membrana celulară şi mişcarea dirijată în nucleul celular.



3'-Azido-2',3'- dideoxitimidina (AZT)



2',3'- didioxiinozina (DDI)

Ca inhibitori au fost testați și inhibitorii revers transcriptazelor — *azidotimidina* (AZT), *dideoxiguanozina* (DDG), 2',3'-*dideoxiinozina* (DDI). Efect semnificativ asupra celulelor imortalizate de om nu s-a înregistrat. După micșorarea inițială a lungimii telomerei, dimensiunea se stabilizează și efect asupra proliferației, morfologiei celulare nu se mai atestă. Studiul, eventual, va continua.

TRANSCRIEREA (BIOSINTEZA RNA)

Spre deosebire de replicare, care antrenează simultan întregul cromozom, transcrierea vizează numai anumite porțiuni de DNA, și anume acelea care codifică proteinele necesare celulei la momentul dat. Structura RNA este concludentă, dictată de structura matricei. *In vivo*, transcrierea este asimetrică, adică într-o anumită regiune se copiază o singură catenă de DNA, desemnată drept catenă sens, spre deosebire de cea netranscrisă — catenă antisens.

În 1961, Sol Spiegelman elaborează *metoda hibridizării*, ce constă în încalzirea dublului helix DNA; depășind temratura de topire, el trece într-o formă unicatenară. La răcirea lentă a soluției, catenele reasociază și formează dublul helix cu o structură nativă. Dublul helix se formează numai în cazul în care catenele de DNA provin din organismele unei specii sau ale speciei înrudite. Dacă secvența bazelor din mRNA e complementară, apoi în combinarea catenelor de DNA și RNA trebuie să formeze fragmente hibrid DNA-RNA (fig. 2.24).

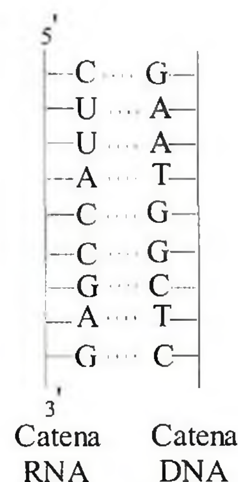


Figura 2.24. ***Secvențele complementare formează hibridul RNA-DNA***

Experimentele au demonstrat că succesiunea bazelor azotate în mRNA sunt complementare succesiunii DNA matrice. În 1960 a fost descoperită enzima ce sintetizează RNA corespunzător succesiunii din DNA matrice.

Pentru sinteza mRNA sunt necesare:

1. Matricea DNA — de preferință dublu helix;
2. Precursori activați — cele 4 ribonucleotide — ATP, GTP, CTP, UTP;
3. Ionii de Mg^{++} sau Mn^{++};
4. Enzima RNAp, ca și DNAp, necesită zincul pentru funcționare;
5. Sinteza are loc în aceeași direcție 5' → 3'. E analog și mecanismul de elongație a lanțului nucleotidic favorizant atacului nucleofil al fosfatului intern din următorul ribonucleotidtrifosfat de grupa 3'-OH ai catenei crescînde. Forța motrice a procesului e hidroliza pirofosfatului respectiv.

Particularitățile procesului de sinteză RNA:

a) RNAp nu necesită prezența primerului;
b) DNA matricea se păstrează intactă;
c) RNAp nu posedă proprietăți nucleazice.



Figura 2.25. ***Structura RNA polimerazei la E.coli***

La eucariote deosebim trei RNAp: RNAp-I ce asigură sinteza rRNA 28 și 18S; RNAp-II-mRNA și acele RNA care pot fi marcate la capete; RNAp-III asigură sinteza tRNA și 5S rRNA, precum și RNA mult mai mici. RNA-polimeraza folosește informația înscrisă în DNA matrice, acest fapt este argumentat experimental (succesiunea bazelor în mRNA e întocmai copia complementară a succesiunii lor în DNA matriceal).

RNAp este o enzimă compusă din cîteva subunități — $(\sigma,\alpha_2\beta\beta')$, adică e o holoenzimă (fig.2.25). Sigma subunitatea alege segmentul de inițiere. Enzima fără sigmă

poartă denumirea de «core» ferment (ferment minim): α subunitățile sunt centrele catalitice, β' — se leagă de DNA, iar β subunitatea fixează substratul — ribonucleotidtrifosfații. Sinteza decurge în mod similar, implicînd următoarele etape:

I. Inițierea sintezei — începe în anumite fragmente de DNA, cu o secvență specifică ce poartă denumirea de promotor. În promotor participă aproximativ 40 de nucleotide și deosebim două locusuri — unul de recunoaștere, depistat cu ajutorul subunității sigma, și o altă secvență — locusul de legare laxă a RNA-polimerazei. Sigma amplifică afinitatea enzimei pentru acest locus de 10^4 ori în raport cu alte locusuri de pe DNA.

1.O importanță deosebită i se atribuie locusului de recunoaștere (7 nucleotide) situat la o distanță de 25 nucleotide de locusul de legare și circa 10 nucleotide de punctul de inițiere (+1). Punctul de start al transcrierii va dicta capătul 5' al transcriptului primar RNA. Promotorii sunt situați în amonte și notați cu minus (convențional). Secvențele în aval față de punctul de start sunt notate cu plus.Se consideră că *secvența Pribnow* la procariote sau *Hogness* la eucariote e responsabilă de exactitatea inițierii (fig. 2.26).

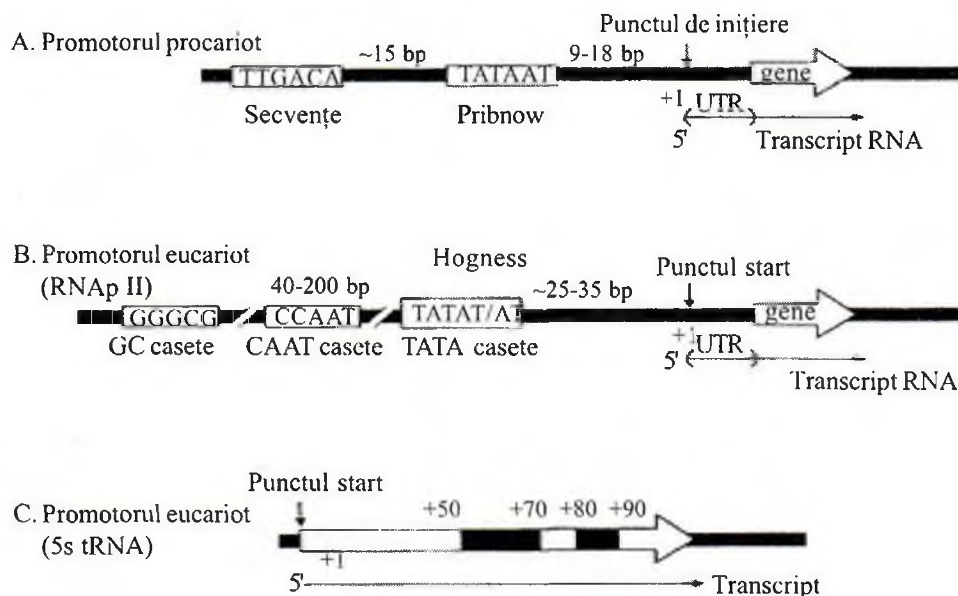


Figura 2.26. ***Secvențele tipice în promotor la pro- și eucariote***

2. Sigma activează identificarea secvențelor de RNA-polimerază.
3. De asemenea ia parte la desfacerea dublului helix al DNA pentru ca aceasta să servească drept matrice și conlucrează la formarea primei legături fosfodiesterice în noua catenă a RNA.

Complexul de inițiere e format, sigma-subunitate e disociată de la holoferment și corfermentul continuă procesul de elongare. Sigma se atașează la alt corferment și ia parte la inițierea unui alt ciclu de transcriere (fig. 2.27).

II. Elongarea decurge după același mecanism descris mai sus. O moleculă de RNAp sintetizează tot transcriptul — fenomenul e procesiv și activează cu o viteză de 50 nucleotide pe secundă (fig. 2.28). RNAp nu controlează catena sintetizată, reducîndu-

se precizia. Se comite o greşeală la 10^{4-5} nucleotide sau de 10^5 mai multe decît în DNA.

III. Finalizarea transcrierii: se reglează foarte fin, la nivelul unor secvenţe nucleotidice specifice de pe catena DNA ce conţin un număr mare de G, C, T, recunoscute de RNAp. Un rol important îl joacă proteina ρ (rho), care se asociază cu enzima şi se mişcă cu ea. La identificarea semnaleleor de terminare coboară de pe matrice, încetînd acţiunea enzimei şi producînd transcriptul cu folosirea energiei ATP. Transcriptul obţinut e autocomplementar şi poate forma perechi de baze, ceea ce generează structuri simetrice, favorizînd expulzarea lui din proces (fig. 2.29).

Dacă catena se extinde în direcţia 5' ⟶ 3', este evident că enzima RNA-polimeraza se mişcă pe DNA în direcţia 3' ⟶ 5' (antiparalel).

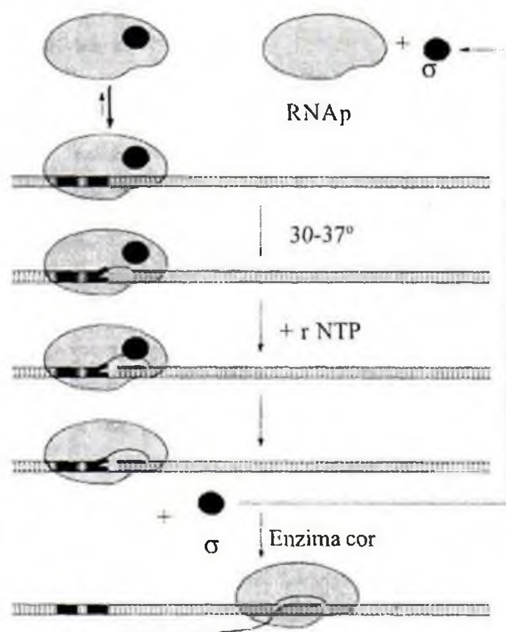


Figura 2.27. ***Iniţierea transcrierii şi formarea complexului de iniţiere. Reciclarea factorului sigma***

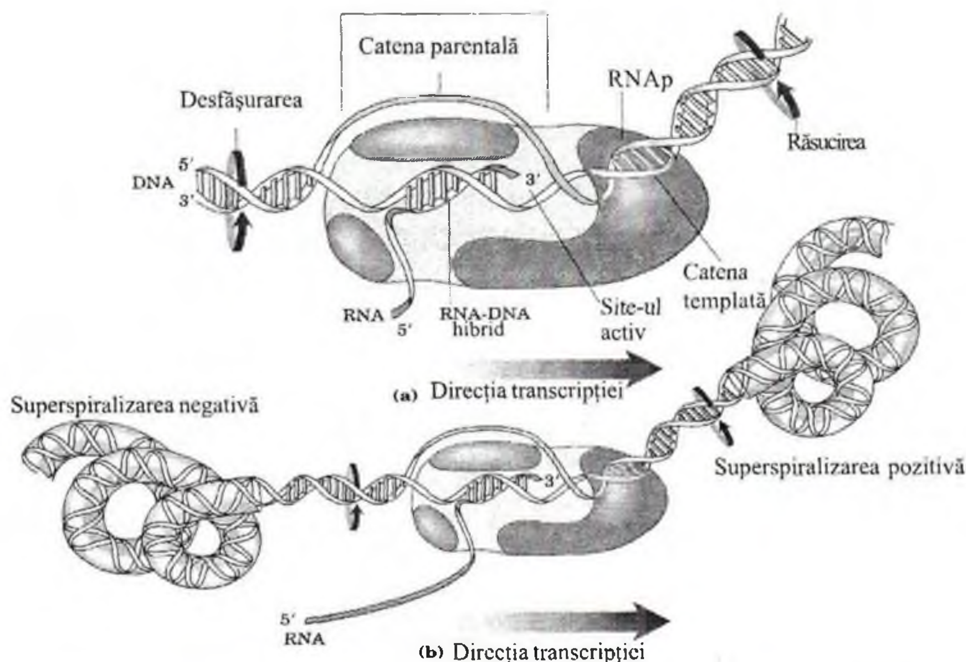


Figura 2.28. ***Transcripţia la E.coli. a) RNAp şi procesele ce sunt cauzate de activitatea ei, b) direcţia elongării***

După procesul de transcriere continuă formarea moleculelor funcțional active de RNA — așa-numitul *procesing,* care constă în următoarele:

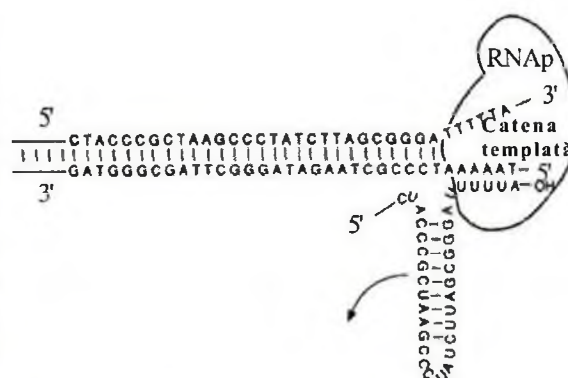


Figura 2.29. *Terminarea independentă de Rho*

1. «Cap»-area. La capătul 5' este adiționată guanozina metilată. În proces sunt utilizate ca substrat GTP, iar donator de grupe CH_3 este adenozilmetionina. Sunt implicate enzimele: fosfohidrolaza, guanil transferaza și metil transferazele.

2.Poliadenilarea. La 3' — o secvență mare de A (100-200). Acest fenomen are loc pînă la terminarea sintezei întregii molecule (e catalizat de poli-A-polimerază). Astfel de "coadă" e necesară pentru exportul moleculelor de RNA din nucleu.

3. Se modifică bazele și resturile glucidice — 2'-OH este metilată (1:100) de S^+-adenozilmetionină, la procariote — 6-dimetil-adenina; se atestă în tRNA, de altfel și pseudouridilatul, ribotimidilatul.

4. Modificarea intensivă pe care o suferă transcriptul primar constă în scurtarea lui.

S-a constatat că mRNA nuclear este mult mai lung decît același mRNA ajuns în citoplasmă. S-a ajuns la concluzia că RNAp realizează o reproducere primară identică cu întreaga genă, apoi intronii sunt excizați și exonii se leagă între ei, formînd mRNA matur, traductibil (fig.2.30).

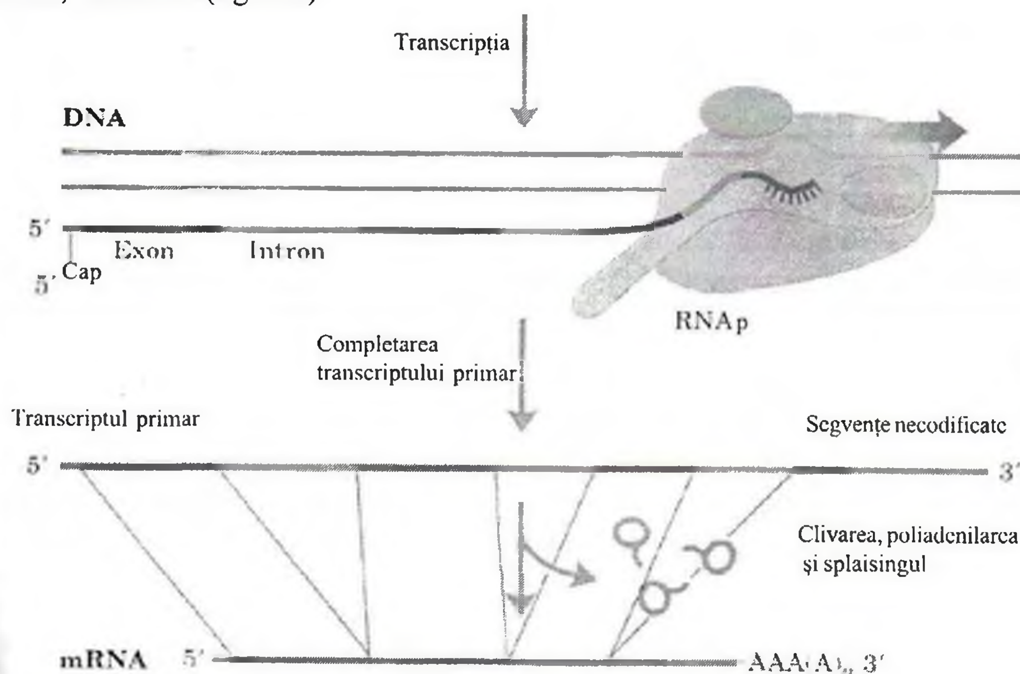


Figura 2.30. *Formarea transcriptului primar și maturizarea RNAm la eucariote*

Secvențele intronilor au dimensiuni de 10-100 ori mai mari decît exonii.

Cum se manifestă excizia intronilor? Așa-numitul *splicing* are loc în nucleul celulei.

a) unele enzime specifice identifică secvențele de baze la joncțiunea intron-exon (excizia pe introni este o excizie incorectă și conduce la generarea unui RNA inactiv ce conține un intron rezidual. În unele β-talasemii are loc descreșterea sintezei a lanțurilor β-globină);

b) în excizia intronilor un rol important îi revine unei categorii de RNA nuclear cu masă moleculară mică, desemnat RNA U (snRNAs), care are o secvență a bazelor complementară cu secvențele de la capetele fiecărui intron. Intronii sunt scoși de RNA nuclear și capetele exonilor corect juxtapuse, apoi sunt sudate într-un aparat enzimatic specializat (fig. 2.31);

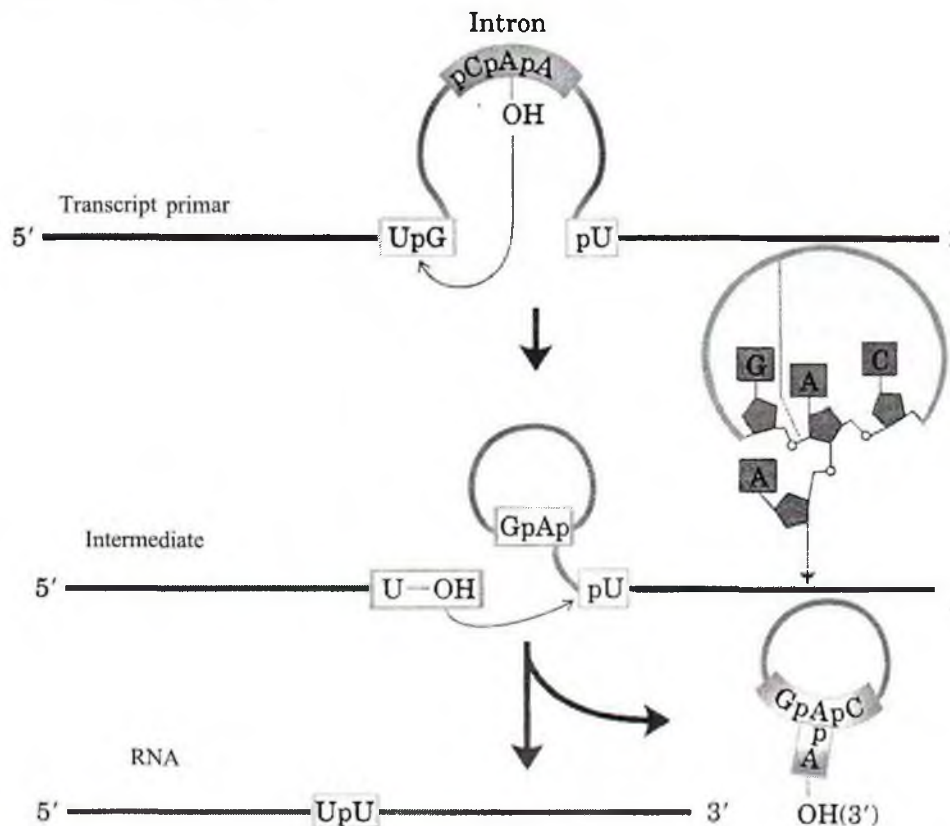


Figura 2.31. ***Sudarea exonilor și excizia intronilor de snRNAs***

c) Thomas Cech a stabilit că pentru excizia intronilor și sudarea exonilor în eprubetă e nevoie numai de RNA, ioni Mg^{2+} și guanozină. Molecula în spațiu ocupă atare poziție, încît capetele secvenței de introni se localizează foarte aproape. Excizia și sudarea decursă în regim autocatalitic, unde singura RNA — segmentul intron — denotă comportamentul enzimei. Guanozina inițiază procesul, iar Mg^{2+} stabilizează structura de RNA - autosplicing. Astfel de RNA a fost denumit *ribozim*. Ribozimul de 10^{10} ori mai repede scindează legătura fosfodiesterică decît prin hidroliza nefermentativă.

Prezența RNA cataliză e demonstrată în multe studii. S-a depistat, bunăoară, o enzimă (Escherichia coli ş.a.) RNA-aza P cu o funcţie specifică — la maturizarea tRNA taie din molecula precursoare un fragment la un capăt. Enzima e compusă din compartiment proteic şi nucleotidic. În unele condiţii, enzima este efectivă şi fără componenta proteică şi nu contrar, cum era de aşteptat. Unele compartimente ale enzimei pot scinda nu RNA, ci polizaharide — ceva nou în enzimologie. Demult s-a observat că extragerea moleculelor mari intacte de RNA e dificilă. Şi numai după descoperirea ribozimelor, s-a clarificat că RNA-aza activă este atributul constant al moleculelor de RNA.

Ribozimul scindează molecula de RNA conform combinaţiei = CUCU =, ceea ce se poate aplica în practică pentru scindarea RNA virotică şi a celei de SIDA.

Transcripţia şi translaţia au loc în diferite compartimente ale celulei. Replicarea, transcripţia pot fi modulate prin intermediul diferitelor substanţe. Efectul preparatelor medicinale sunt ilustrate în figura 2.32.

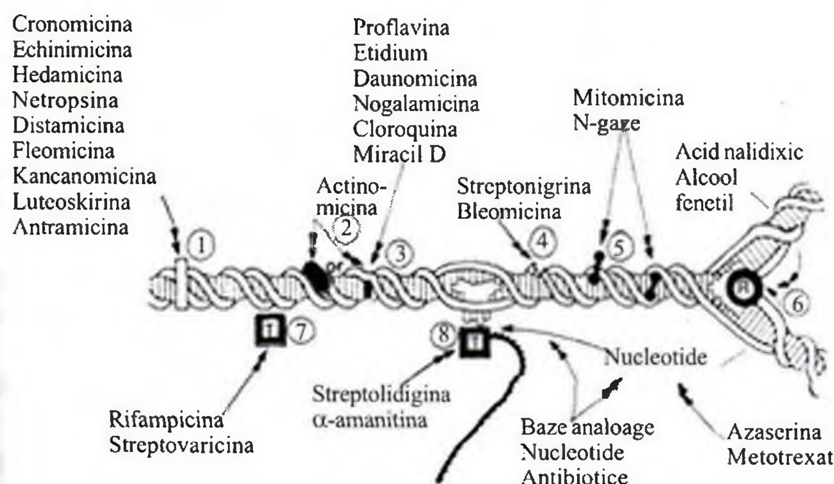


Figura 2.32. ***Locul acţiunii unor medicamente***

1. O fixare noncovalentă cu DNA, ce împiedică replicarea.

2. Se leagă rigid în duplex, joncţionînd cu guanina şi inhibînd activitatea DNA ca matrice pentru RNA polimeraza (inhibă transcripţia). Acţionează similar: doxorubicina (adriamicina), cronomicina A şi distamicina.

3. Se fixează de DNA, fără a modifica structura helixului.

4. Medicamente ce rup punţile în DNA.

5. Preparate ce formează legături covalente între spiralele de DNA.

6. Substanţe ce fixîndu-se în bifurcaţie împiedică replicarea.

7. Inhibă sigma şi beta subunităţi de RNAp, îngreuind iniţierea procesului de transcripţie.

8. Inhibă RNA-polimeraza II (α-amanitina etc.); preparatele ce conţin platină (cisplatina şi carboplatina) induc formarea legăturilor transversale în DNA.

Structura subnucleozomică a cromatinei se menţine în procesele de transcriere şi replicare.Dret matrice serveşte complexul DNA histonic, dar nu DNA liber. RNA sintetizat se împachetează în complexe ribonucleoproteidice.

DNA netranscriptibil (linker) ia parte la procesul de reglare a transcrierii, servind drept promotor pentru RNAp II.

Elementele mai importante sunt blocurile TATA şi CAAT situate la o distanţă de 25-100 pn de la punctul de iniţiere. Este descrisă prezenţa unor elemente reglatoare localizate în diferite regiuni ale DNA, numite *enhancers* şi *silancers*.

Se presupune o modalitate anume în împachetarea RNA. După cum împachetarea DNA în cromatină e menită să determine funcţionarea ei normală în celulă, procesul (insuficient studiat) condensării RNA cu proteinele nucleice e necesar pentru decurgerea perfectă a procesingului primar — RNA transcript cu transportul lor în citozol. Se ştie că numai 5% din masa totală a RNA transcript părăseşte nucleul celular. Semnalele specifice care servesc ca permis pentru părăsirea nucleului nu sunt identificate. E dovedit faptul că astfel de semnale apar în procesul de splicing al RNA. S-a argumentat că dacă în secvenţa nucleotidică nu sunt intronii, RNA transcript va rămîne în nucleu.

Particularităţile transcrierii la eucariote

Procesul de transcriere la eucariote este foarte complex, deşi în principiu decurge după acelaşi mecanism ca şi la procariote.

a) Dacă la procariote toate tipurile de RNA sunt sintetizate de aceeaşi RNA-polimerază, la eucariote intervin mai multe tipuri, fiecare transcriind seturi diferite de gene. De asemenea, dacă la procariote RNA-polimeraza era formată din 5 subunităţi, la eucariote acestea sunt constituite din 9-11 subunităţi.

În sinteza RNA la eucariote intervin patru tipuri de polimeraze: trei expuse mai sus şi al patrulea tip - RNA-polimeraza mitocondrială ce sintetizează toate tipurile de RNA mitocondrial.

RNA-polimeraza II şi RNA-polimeraza III sintetizează şi RNA nuclear de mici dimensiuni. Fiecare tip de RNA-polimerază utilizează promotori diferiţi, aceştea fiind extrem de variaţi pentru RNA-polimeraza II care produce sinteza mRNA.

Dacă considerăm poziţia de start 1 (locul unde începe transcrierea genei structurale RNA-polimeraza II), există mai multe regiuni care condiţionează această poziţie:

- în poziţia 35 se află caseta Hogness care este recunoscută de RNA-polimeraza II şi prin urmare e responsabilă de acurateţea transcrierii;

- spre capătul 5, la o distanţă mai mare de promotor se află caseta CAAT, care se pare că este responsabilă de frecvenţa cu care se transcrie gena structurală.

Elementele de control *enhancers* şi *silancers* îşi exercită acţiunea numai în urma interacţiunii cu nişte proteine specifice numite *factori de transcriere*, care induc modificări în molecula de DNA, avînd ca rezultat modificarea vitezei de transcriere a genei.

b) La eucariote transcrierea se realizează pe DNA complexat în nucleozomi, fără să fie necesară desprinderea lui.

c) Frecvenţa cu care se transcrie o genă este foarte diferită şi depinde de necesarul de proteină codificată de gena respectivă.

Pentru majoritatea genelor transcrierea se face rar, astfel încît transcriptaza parcurge întreaga genă înaine ca o altă transcriptază să se lege. Pe alte gene însă transcrierea are loc cu frecvenţă mare; este vorba de genele care codifică sinteza unor proteine de care organismul are nevoie în cantitate mare. În acest caz de genă se leagă simultan mai multe transcriptaze, alcătuind o aşa-numită *«unitate de transcriere»*.

d) S-au depistat mecanisme alternative ale procesingului în complexul transcripțional la eucariote (fig.2.32a).

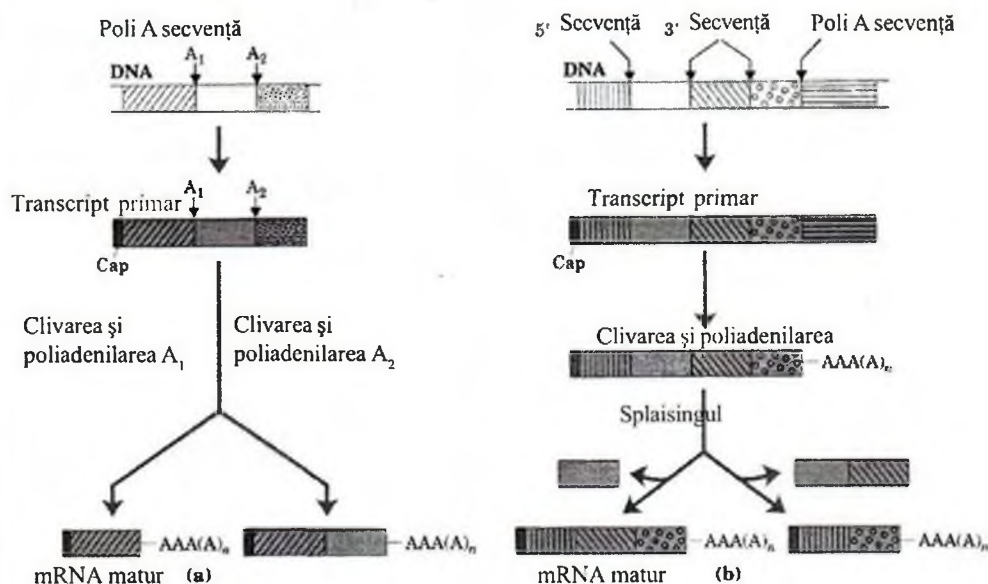


Figura 2.32a. ***Mecanisme alternative ale procesingului la eucariote***

e) RNA nou-sintetizat este împachetat imediat sub forma unor complexe ribonucleoproteice, prin asocierea cu proteinele specifice. Aceste complexe sunt similare nucleozomului, avînd forme globulare.

f) Transcrierea DNA la eucariote, ca de altfel și la procariote, poate fi oprită; aceasta se realizează (fig.2.32):

- fie prin distorsionarea structurii DNA, astfel încît acesta nu mai poate servi ca matrice;
- fie prin inhibarea RNA-polimerazei.

Sinteza DNA pe matricea de RNA

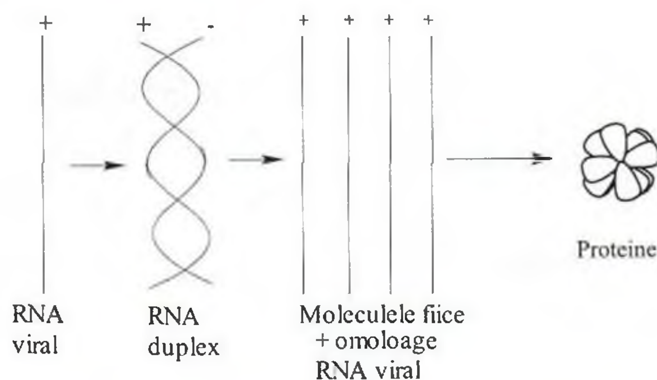
În virușii oncogeni s-a identificat o enzimă care a completat conceptul exprimat prin "dogma centrală" a geneticii moleculare, în care fluxul de informație are sensul DNA ⟶ RNA ⟶ proteina. Enzima e *revers transcriptaza* - și prezintă o DNA polimerază RNA dependentă. Ea posedă proprietatea, pătrunzînd în celula-gazdă, de a sintetiza un hibrid DNA-RNA, adică pe matricea de RNA a virusului generează o catenă de DNA. RNA viral este degradat enzimatic, iar catena DNA se autoreplică, dînd naștere la dublul helix de DNA, ce conține informația prezentă în RNA viral. DNA se inserează în genomul-gazdă, avînd capacitatea de a se exprima ca proteină. Se consideră că fiecare subiect este purtătorul unor gene oncogene neexprimate, fiind un rezultat al pătrunderii anumitor retroviruși în organism într-un moment al evoluției. În anumite condiții nefavorabile pentru organism, poate avea loc transcrierea, traducerea și malignizarea celulei. Cu ajutorul acestei enzime se poate construi artificial pe orice matrice de RNA un DNA complementar, adică se pot obține gene sintetice care, prin tehnicile ingineriei genetice, produc mari cantități de proteină codificată.

Biosinteza RNA pe matrice de RNA

Materialul cromozomial al unor viruşi RNA este replicat în celula gazdă sub acţiunea unei replicaze — *RNA polimeraza — RNA dependentă.*

Ca răspuns la infecţia virală, ele se sintetizează în celula-gazdă, au o acţiune surprinzătoare, folosind RNA virusului ce se replică. RNA sintetizat nu e complementar, ci identic cu al virusului — RNA viral (+).

Catena RNA (-) va servi ca matrice pentru sinteza numeroaselor catene complementare (+) virale, care (RNA viral) vor funcţiona ca RNA matrice pentru sinteza proteinelor virale (spre deosebire de RNA al retroviruşilor).





Francois Jacob



Laques Monod



Tomas Cech



Paul Zamecnik



George Palade

CODUL GENETIC

Noțiunea de genă s-a concretizat şi am putea afirma că *gena este un fragment al DNA, transcris în molecula de mRNA ce codifică un lanț polipeptidic sau are o semnificație funcțională particulară* (tRNA etc). După descoperirea din a.1977 a intermitenței genelor, noțiunea nu s-a schimbat, însă unele fragmente ale DNA, datorită splicingului alternativ al RNA primar — transcript, pot asigura sinteza a mai mult de 2 mRNA şi, în consecință, a mai mult de 2 proteine, fiecare cu funcția sa. Rămîne admisibilă ideea că o genă determină sinteza unui lanț polipeptidic.

Informația genetică referitor la biosinteza proteinelor se transmite cu ajutorul codului genetic ce reprezintă forma de exprimare a relației dintre secvența de nucleotide din DNA şi succesiunea de aminoacizi din lanțul polipeptidic.Avînd 4 nucleotide şi 20 de aminoacizi, este evident că un aminoacid este reprezentat de 3 nucleotide — codul este triplet şi poate oferi 64 de posibilități pentru cei 20 de aminoacizi. Şi toate tripletele sunt numite *codoni*. Ei (codonii) sunt identificați consecutiv de moleculele de tRNA, care îndeplinesc rolul de adaptor în sinteza proteinelor (tab.2.1).

Tabelul 2.1. ***Codul genetic***

I (5')	II				III (3')
	U	C	A	G	
U	UUU } Phe UUC UUA } Leu UUG	UCU UCC } Ser UCA UCG	UAU } Tyr UAC UAA } Codon UAG term.	UGU } Cys UGC UGA Cod.ter UGG Trp	U C A G
C	CUU CUC } Leu CUA CUG	CCU CCC } Pro CCA CCG	CAU } His CAC CAA } Gln CAG	CGU CGC } Arg CGA CGG	U C A G
A	AUU AUC } Ile AUA AUG Met	ACU ACC } Thr ACA ACG	AAU } Asn AAC AAA } Lys AAG	AGU } Ser AGC AGA } Arg AGG	U C A G
G	GUU GUC } Val GUA GUG	GCU GCC } Ala GCA GCG	GAU } Asp GAC GAA } Glu GAG	GGU GGC } Gly GGA GGG	U C A G

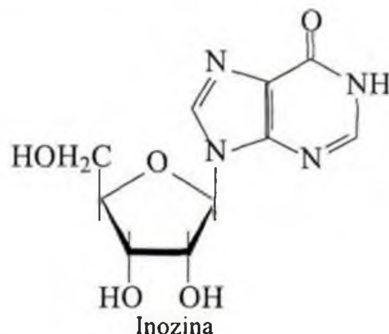
Proprietățile codului genetic

Este un *triplet* în care 61 codoni codifică aminoacizii corespunzători, 3 codifică terminația sintezei proteice.

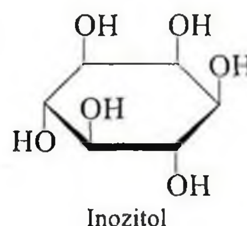
Codul este degenerat — unui aminoacid poate să-i corespundă mai mulți codoni: Arg, Leu, Ser, fiecare fiind codificat de cîte 6 codoni, însă Met şi Trp sunt specificați de către un singur codon (tab.2.1a). Codonii unui aminoacid sunt *sinonime*. Specificitatea codonului e determinată de primele două litere. Degenerarea se referă la nivelul nucleotidului 3 din codon. Primele două baze sunt constante. F.Crick a conchis că asocierea nucleotidelor 1 şi 2 din codon cu nucleotidele 3 şi 2 din anticodon este fixă,

respectîndu-se principiul complementarităţii, în timp ce împachetarea nucleotidelor 3 din codon şi, respectiv, 1 din anticodon este laxă. Aceasta se datorează particularităţii nucleotidelor 1 din anticodon (5') de a se împerechea şi cu alte nucleotide, în pofida regulilor lui Watson şi Crick.

Foarte des nucleotidul 1 din anticodon e inozina, care oscilează (este bază şovăielnică) şi e dispusă să încalce regulile (*efectul Wobble*).



Inozina



Inozitol

Dacă toate legăturile vor fi de tip W-C, atunci orice aminoacid ar fi acceptat de un singur codon, iar deblocarea din complexul de sinteză s-ar complica, ceea ce ar micşora considerabil viteza procesului de sinteză. Anume degenerarea codonului favorizează eliberarea din complex a tRNA. Degenerarea codului minimalizează efectele nocive ale mutaţiilor şi permite componenţei nucleotidice a DNA să varieze în diapazon larg, nemodificînd secvenţa aminoacidică în proteina codificată de acest DNA.

Codul nu are virgule sau alte semne de punctuaţie ce ar indica începutul şi sfîrşitul fiecărui codon. Citirea mesajului genetic se face neîntrerupt de la codonul start pînă la cel final.

Codul genetic este universal — toate vieţuitoarele utilizează acelaşi mecanism de a asimila informaţia (abaterea prezintă codul genetic al mitocondriei).

Codul genetic nu este ambiguu (acelaşi triplet nu semnifică 2 aminoacizi diferiţi), *nu se suprapune* (prezintă excepţie la virusuri).

Codul genetic prezintă o structură liniară (este coliniar, adică există o concordanţă liniară între genă şi aminoacizii proteinei codificate).

De remarcat că *tripletul AUG reprezintă codonul de iniţiere,* iar cei trei UAG, UAA, UGA de terminare (nonsens). Există unele deosebiri în secvenţa nucleotidică la DNA mitocondrial.

Tabelul 2.1a. ***Degenerarea codului genetic***

Aminoacidul	Numărul de codoni
Ala	4
Arg	6
Asn	2
Asp	2
Cys	2
Gln	2
Glu	2
Gly	4
His	2
Ile	3
Leu	6
Lys	2
Met	1
Phe	2
Pro	4
Ser	6
Thr	4
Trp	1
Tyr	2
Val	4

Studiile mai recente au confirmat că proprietățile chimice ale unor aminoacizi sunt reflectate în structura codonului: toți *codonii* cu U (în poziția 2) codifică aminoacizi hidrofobi, iar cei ce au în poziția 2 *adenina* codifică aminoacizii polari sau cu sarcină; *guanina*, respectiv, aminoacizi polari sau nepolari, iar *uracilul* în poziția 1 prezintă codonii nonsens.

Dacă în anticodon în direcția (5' ⟶ 3') prima bază nucleotidică e:

a) citozina sau adenina, el va citi un singur codon;

b) uracilul sau guanina, el va citi 2 codoni;

c) inozina, respectiv, va citi 3 codoni.

Recunoașterea a unui codon:		
Anticodon	(3') X–Y–**C** (5')	(3') X–Y–**A** (5')
Codon	(5') Y–X–**G** (3')	(5') Y–X–**U** (3')
Recunoașterea a doi codoni:		
Anticodon	(3') X–Y–**U** (5')	(3') X–Y–**G** (5')
Codon	(5') Y–X–**A/G** (3')	(5') Y–X–**C/U** (3')
Recunoașterea a trei codoni:		
Anticodon	(3') X–Y–**I** (5')	
Codon	(5') Y–X–**A/U/C** (3')	

S-a demonstrat că codonii sinonimi pentru aminoacid, dacă se deosebesc după cel puțin una din cele două baze (1-2), au nevoie de tRNA diferite: UUA și CUA codifică leucina, dar se atestă de tRNA diferite.

În 1977 s-a stabilit că genele au structură întreruptă — gena lanțului β al hemoglobinei (exonul) este întrerupt de secvențe netranscriptibile numite *introni*. Gena ovalbuminei are 8 exoni și 7 introni (fig. 2.33). 50 introni are gena colagenului. Lungimea intronilor variază de la câteva nucleotide până la zeci de mii de perechi. O proprietate a intronilor este localizarea conservativă în genele înrudite la aceeași specie sau în aceleași gene la diferite specii. Dar secvența nucleotidică e puțin conservativă. Practic, conservative sunt primele 2 și ultimele 2 baze în introni (GT ... AG) în locusuri de site ai splicingului.

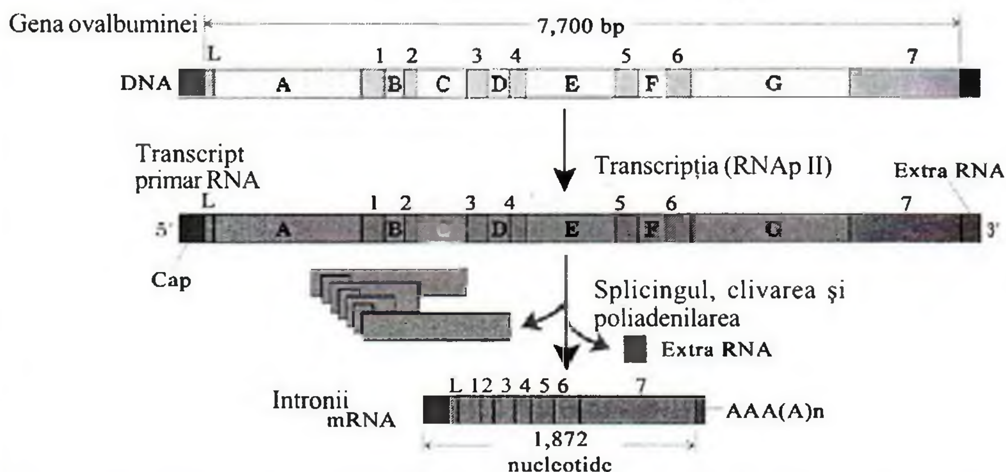


Figura 2.33. ***Structura genei ovalbuminei și modificările posttranscripționale ale RNA primar transcript cu formarea unei mRNA mature (zonele hașurate prezintă intronii)***

O proprietate de expresie a genei este: localizarea exonilor în mRNA și în DNA în aceeași secvență. Intronii confirmă caracterul evolutiv al materiei vii formate în urma evoluției genei corespunzătoare. Fiecare exon corespunde unui domeniu, care apoi,

unindu-se, formează proteine cu proprietăți noi. Actualmente, e cert că fiecare domeniu este codificat de gena sa şi intronii sunt o dovadă concludentă a structurii polidomenice a proteinelor.

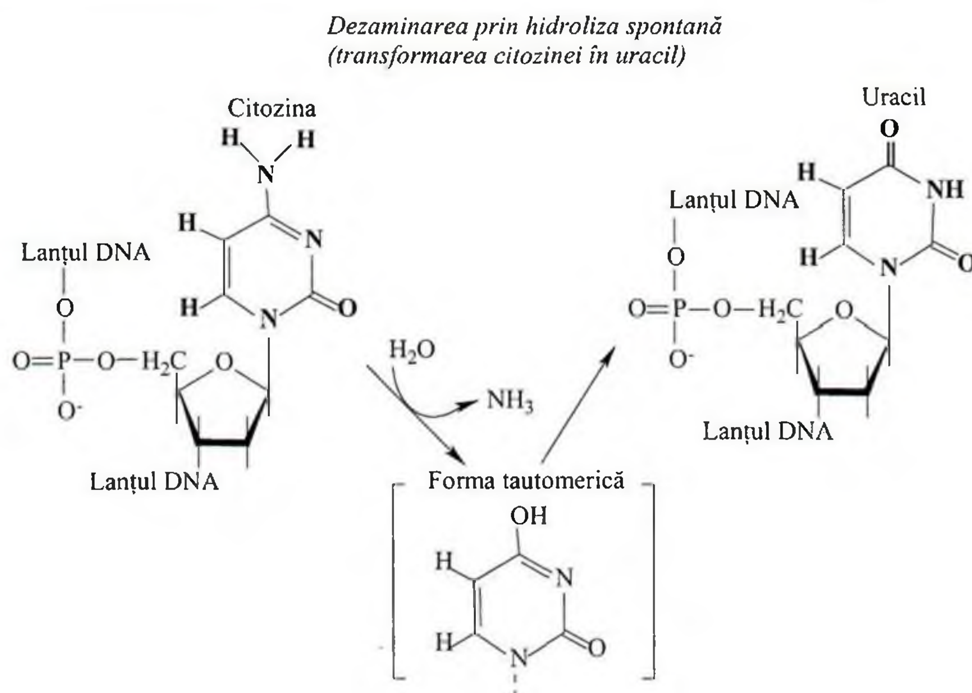
S-a subliniat mai sus că excizia intronilor reglează torentul de RNA din nucleu în citozol şi, în final, proteina ce va sintetiza celula.

MUTAȚIILE

Mecanismele de corecție şi reparație ale DNA sunt eficace, dar totuşi o parte din leziuni şi erori din DNA rămîn intacte. Apar modificări în genomul organismului care se mențin şi se transmit prin ereditate. Aceste evoluări constante în *secvența de nucleotide transmise ereditar poartă numele de* ***mutații***.

În viața reală a unui individ ele se manifestă rar cu o probabilitate egală cam cu 10^{-5}. *Mutațiile* sunt schimbări intermitente şi rare care constau în modificări ale informației genetice şi care devin apoi stabile în succesiunea generațiilor.

Dezaminarea prin hidroliza spontană (transformarea citozinei în uracil)



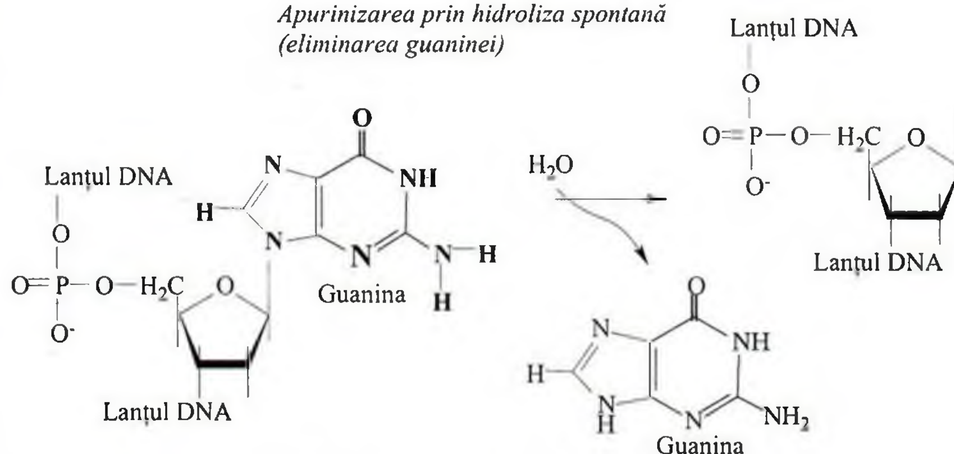
Modificărilor pot fi supuse o pereche de baze (mutații punctiforme) sau un grup de baze pe una sau pe ambele catene ale unei molecule de DNA.

Mutațiile punctiforme decurg prin:

1. *Substituție* (misens mutații), în care deosebim 2 tipuri:

a) *tranziție* — o pereche de purină este înlocuită tot cu o purina sau o bază pirimidinică, înlocuită tot cu una pirimidinică.

Acidul azotos produce mutații prin tranziție, dezaminînd adenina (A=T) în hipoxantină care se împerechează cu citozina (HX=C); tot acest acid modifică guanina la xantină şi citozina la uracil, producînd mutațiile respective.



Tranziție provoacă şi astfel de *agenți mutogeni* ca 5-brom-uracil, 2-amino-purină, modificînd legile complementarității la replicare: 5-brom-uracil, analog al timinei, dar se împerechează cu guanina şi 2-amino-purina, analog al adeninei, dar se leagă cu citozina.

Watson şi Crick au postulat perfect mecanismul tranziției — atomii de hidrogen din cele 4 baze îşi schimbă poziția — se dispun în forme tautomere care, la rîndul lor, formează perechi cu alte baze ca: iminoforma A ce se împerechează cu citozina etc.

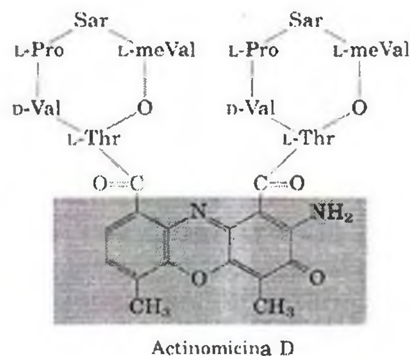
b) *transversie* — o pereche de baze purinice este substituită cu una pirimidinică sau viceversa.

2. *Insertie*. Acest mecanism constă în introducerea unei perechi de baze suplimentare în catena de DNA. Acridina, intercalîndu-se în DNA, la replicare pe catena complementară se împerechează cu o bază suplimentară sau duce la deleția unei baze din acel lanț.

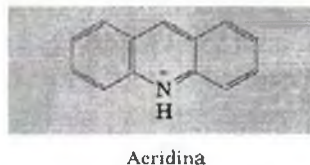
3. *Deletia* constă în excluderea unei perechi de baze: posibilă la hidroliză, modificări de pH, temperatură; unii agenți modifică o bază în aşa mod, încît ea nu mai poate fi complementară, şi la replicare apare "golul" în ambele catene.

4. Unele modificări în secvența nucleotidică pot forma codonul sinonim şi succesiunea aminoacizilor nu se va schimba (mutații benigne).

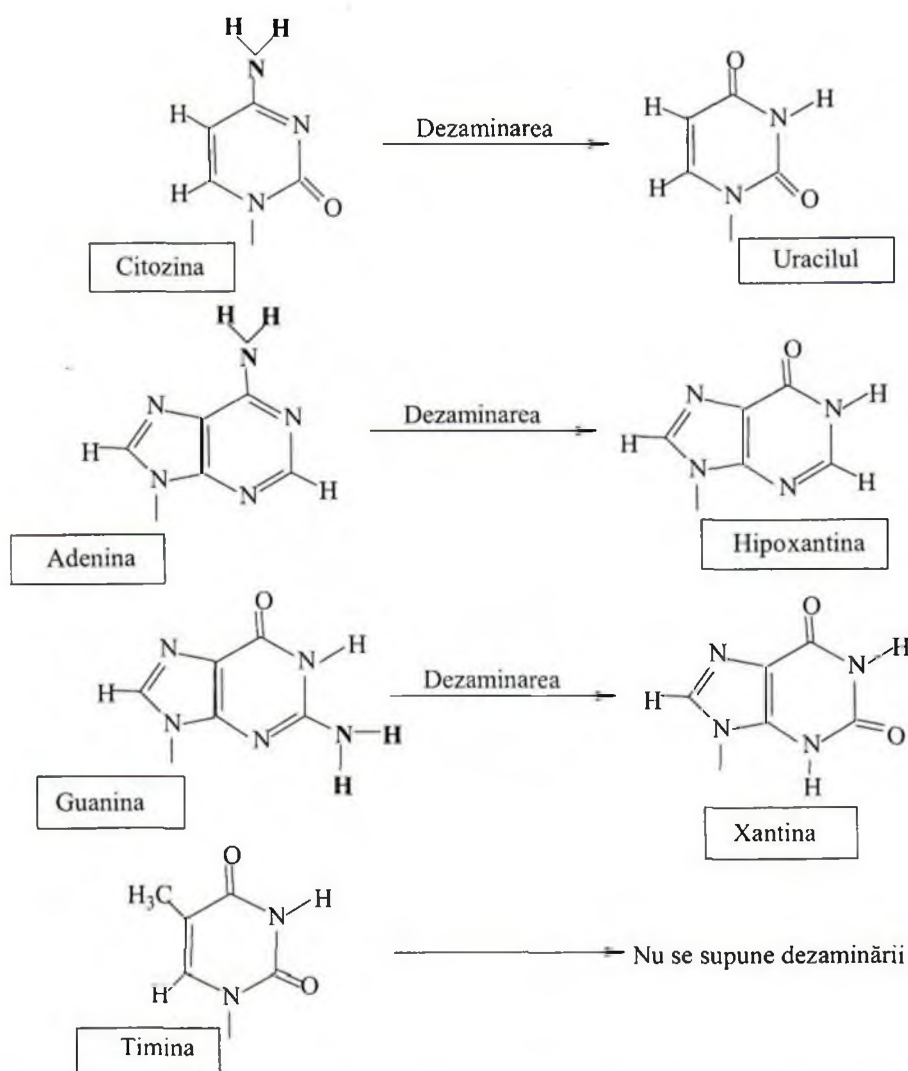
La afectarea segmentelor mari de genă apar *mutații extinse*. Agenții mutageni pot provoca atît *mutațiile spontane*, cît şi *mutațiile induse*. În dependență de consecințele modificărilor, deosebim *mutație benignă, neutră, nocivă*. O grupă deosebită prezintă *mutațiile nonsens*, unde are loc înlocuirea unui codon cu altul



Actinomicina D



Acridina



nonsens, ce provoacă întreruperea lanțului polipeptidic. S-a confirmat existența unor *mutații supresoare* bazate pe funcționarea unor tipuri de tRNA, care, deși poartă anticodonul corespunzător unui triplet nonsens, sunt încărcați cu aminoacizi. Ca rezultat, lanțul polipeptidic nu se întrerupe fiind introdus un nou aminoacid. Provocînd în cadrul investigațiilor experimentale un proces mutațional, regenerăm caracterul sălbatic în locul celui mutant. Atare mutații sunt denumite *mutații inverse - reversii.*

În ultimii ani s-au elucidat mutațiile la hotarul *exon-intron,* unde se inactivează site-ul splicingului, ce nu scindează intronul de exon în locul cuvenit. Deseori funcția acestui site o preia alt locus din secvența nucleotidică și molecula de mRNA e rar modificată.

S-au depistat și *mutațiile punctiforme în introni* ce modifică splicingul; așa mutații au loc la unele tipuri de talasemii, unde dispar mai mult semnalele de splicing favorizînd sinteza a două tipuri de mRNA normală și defectă (respectiv, 10% mRNA normală și 90% defectă).

Cum se pot depista mutagenii cancerigeni? Examinînd efectul mutagen pe bacterii, Bruce Ames a elaborat o metodă simplă şi sensibilă pentru a depista mutagenii chimici. În piuliţa Petri se aranjează un strat subţire de agar-agar ce conţine 10^9 celule de tulpină specială de Salmonelă (tulpină ce nu se dezvoltă în lipsa histidinei, fiindcă conferă mutaţii în gena biosintezei acestui aminoacid). Mutagenii generează multe mutaţii, iar o parte din ele conduc la reversii şi, ca rezultat, celulele încep să sintetizeze şi histidina. Aceşti revertanţi apăruţi se înmulţesc în lipsa histidinei exogene şi formează colonii aparte. După incubaţia ce durează două zile la temperatura de 37°C, se atestă efectul mutagen al substanţelor chimice.

Studiile recente confirmă că acumularea catastrofală a erorilor în moleculele de DNA e cauza îmbătrînirii organismului. La cele amintite mai sus se adaugă şi varianta cu modificarea tabloului metilării bazelor nucleice. Savanţii de la Institutul de Gerontologie al Institutului Naţional al Cancerului SUA (1987) au stabilit că la şoarecii cu durata vieţii de 42 luni numărul nucleotidelor metilate din DNA la o celulă se micşorează cu 47 mii într-o lună. La o altă specie, cu o longevitate de 96 luni, timpul de pierdere e de 23 mii pe lună — adică de 2 ori mai mic. Şoarecii pier atunci cînd scăderea metil-citozinei ajunge pînă la 2 milioane la celulă.

S-au studiat celulele omului, constatîndu-se că viteza pierderii e mai mică. Celulele bronhiilor pierd lunar 1,3 mii, avînd acelaşi număr de baze metilate — 13-10 milioane. Dacă admitem că legitatea stabilită la animale e valabilă şi pentru oameni, atunci ei pot trăi circa 125 de ani.

De altfel, este remarcabil că în celulele cancerigene nivelul bazelor metilate se menţine permanent la nivelul standard. E posibil că ceasul metilic e veriga principală în lanţul de cauze şi consecinţe ce determină îmbătrînirea şi moartea individului.

RECOMBINAREA GENETICĂ (INGINERIA GENETICĂ)

Unele modificări în gene şi cromozomi reprezintă un fenomen normal în viaţa celulei - un schimb biologic adecvat între gene sau grupări de gene din diferite focare cu formarea unui cromozom metamorfozat capabil de replicare, transcriere şi translare. Procesul se numeşte ***recombinare genetică.***

Recombinarea genetică decurge în toate organismele şi, fireşte, e posibilă numai în cadrul aceleiaşi specii, constituind în final criteriul de definire a speciei. Pentru eucariote e caracteristică recombinarea reciprocă, unde cantitatea de material genetic transformat este proporţională. Ea presupune segregarea şi sinaptizarea regiunilor omoloage din cromozomi şi schimbul reciproc de nucleotide realizat prin ruperea moleculelor de DNA, translocarea segmentelor rezultante şi reunirea lor. Recombinarea e determinată de un aparat complicat enzimatic ce implică consum de energie enormă. Modificările pe care le suferă molecula de DNA reprezintă mecanismul principal al evoluţiei şi al polimorfismului, de rînd cu selecţia naturală.

Recombinarea genetică experimentală presupune includerea în genomul unui organism a unor gene ce nu figurează în patrimoniul ereditar al acestuia. Se atestă mai multe tipuri:

1. *Transformaţia* — DNA celulei donatoare se implică în genomul recipientului (implantarea virusului în celula sănătoasă).

2. *Lizogenie* — DNA se încadrează în cromozom, dar nu se manifestă. Un fenomen neordinar stimulează mecanismul de expresie a genei mute şi în final se formează particule ce vor distruge celula-mamă (virusul herpesului).

3. *Transducția* — transferul unei părți de informație de la DNA (ataşată covalent) în DNA parental celulelor-fiice şi replicarea lor în continuare.

4. *Conjugația* — proces natural de unire a genelor la eucariote, cu o maximă precizie fără modificări — conjugație sexuală.

Unele gene sau grupe de gene la pro- sau eucariote pot abandona poziția inițială, ocupînd alt loc în genom. Atare elemente genetice flexibile se numesc *transpozoni*. Capacitatea de inserție se datorează unor fragmente scurte la capetele transpozonului - secvențe inserționale numite IS-elemente. Procesul e determinat de un sistem ce recunoaşte secvențele şi le sudează în loc nou.

Un tip neobişnuit de recombinare genetică se observă în procesul formării genelor, ce determină *sinteza anticorpilor* — imunoglobulinelor produse de limfocite, ca răspuns la pătrunderea în organism a antigenului. Fiecare antigen e capabil să joncționeze cu imunocitele unui tip specific, provocînd creşterea, mitoza celulelor respective, formînd clona unicală, adică un *aliniament* de limfocite identice, care vor elabora un tip de imunoglobuline specifice şi vor fixa antigenul care a condiționat înmulțirea lor. În interacțiunea antigen-anticorp se formează complexul în care antigenul îşi pierde activismul.

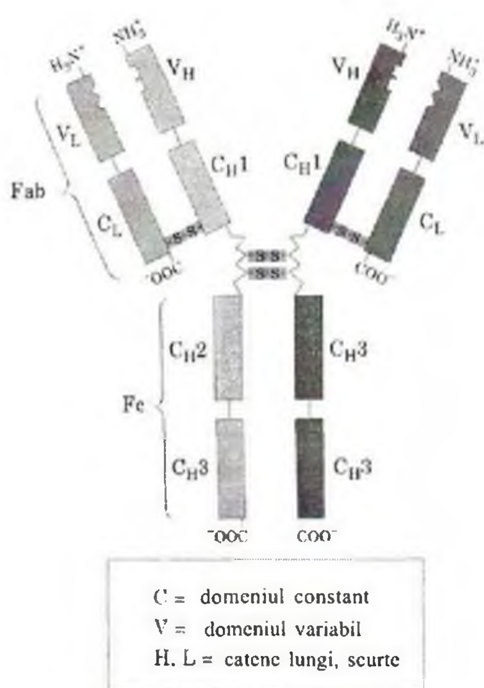


Figura 2.34. ***Structura IgG***

E uimitor faptul că organismul nostru poate sintetiza milioane de anticorpi drept răspuns la orice macromoleculă. Oare e posibil aşa ceva? Celulele noastre nu conțin atît DNA, încît să codifice milioane de anticorpi, nemaivorbind de activitatea individuală a organismului uman.

Răspunsul a fost căpătat, studiind structura anticorpilor şi a genelor ce-i codifică (fig. 2.34, 2.35). Molecula anticorpilor e compusă din 2 catene lungi (H) cu cîte 446 aminoacizi fiecare şi 2 catene scurte (L), respectiv, cu cîte 214 aminoacizi fiecare. Catenele sunt unite prin legături disulfidice; legăturile S-S sunt şi intracatenare. Fiecare lanț dispune de regiuni segmentare de aminoacizi constante — C şi o regiune variabilă — V; C-fragment e compus din 3 domenii H şi 1 domeniu L. V-regiunile au locusuri de o variabilitate extraordinar de mare, numite hipervariabile. Fiecare lanț conține cîte trei locusuri — centre antigenofixatoare, compatibile cu antigenul. Fixarea e datorată legăturii de hidrogen, punților saline, interacțiunii hidrofobe, legăturii Van der Waals.

Localizarea în anticorpi a regiunilor C şi V ne permite să concluzionăm că DNA

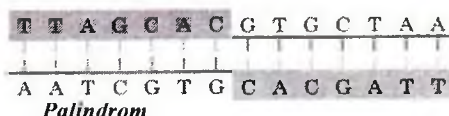


Figura 2.35. ***Structura domenică conformațională a moleculei de imunoglobulină***

ce le codifică e rezultatul sudării a două gene pentru C și V - fragmente. S-a adeverit experimental această ipoteză. Ulterior, s-a stabilit că DNA ce codifică fragmentele variabile atît în H, cît și în L-catene sunt compuse din gene de diferite tipuri care-și schimbă poziția și pot forma diverse îmbinări. În DNA - V - fragmentele au aproximativ 400 V gene, 12 D (Diversity), 4 J (de legătură) gene. Combinarea acestor gene face posibilă mai mult de 20000 de variante, care, la rîndul lor, se modifică în secvența nucleotidică la adiționarea cu fragmentele de DNA ce codifică regiunea C. În consecință, pot fi formate milioane de gene diferite cu circa 10^{10} centre antigenofixatoare responsabile de sinteza anticorpilor.

Combinații noi de gene — *o recombinație artificială* — pot fi create și în eprubetă. Un rol decisiv l-au jucat elaborările *enzimelor de restricție* — endonucleaze ce recunosc în molecula de DNA o secvență anumită de baze. Enzimele cliveazā legătura fosfodiesterică de pe ambele catene într-un loc special al secvenței recunoscute — secvențele cunoscute sunt *palindroame*. Evident, capetele rezultante pot fi necoezive sau coezive (conțin nucleotide complementare).

Un alt ferment este *terminal-transferaza* —, o enzimă care posedă capacitatea de a adăuga la capetele 3'-OH ale celor două molecule ce trebuie sudate cozi homopolimerice complementare (poli G, poli C) (fig.2.36).



Enzima *revers — transciptaza* — permite sinteza unui DNA recombinat pe mRNA, adăugînd poli T și dezoxiribonucleotidele respective, apoi se înlătură mRNA și cu ajutorul DNAp I reconstruim catena complementară.

Genele recombinate se includ într-un vector potrivit (o moleculă de DNA), care se introduce într-o celulă, unde se produce replicarea și exprimarea genotipică. Ca vector se folosesc *plasmidele* (DNA bicatenar din citozolul majorității bacteriilor). Ele se deplasează ușor de la o celulă la alta. Aceste molecule mici trec prin membrana celulei-gazdă și pot asimila cu ușurință gene străine (2.36.a). Ele se replică autonom și rapid, fapt ce permite amplificarea genei incluse. Selecționarea lor prin screening ne permite să identificăm genele respective (fig. 2.36).

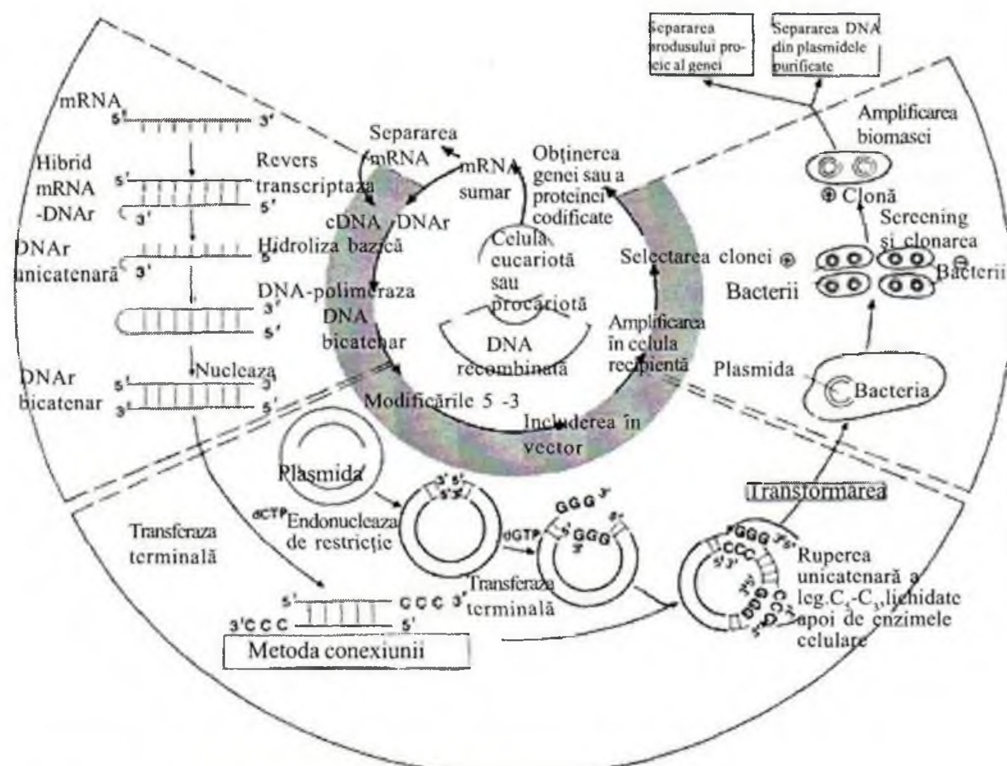


Figura 2.36. *Ingineria genetică: clonarea genelor*

Clonarea genelor a rezolvat problema insulinei, interferonului şi a multor alte substanţe biologice active ca hormonul somatotrop etc.

Interferonul reprezintă o glicoproteină cu 160 aminoacizi; fiecare specie produce, în urma infecţiei virotice, cel puţin 3 tipuri de interferon în: 1) leucocite; 2) T-limfocite; 3) fibroblaştii ţesutului conjunctiv.

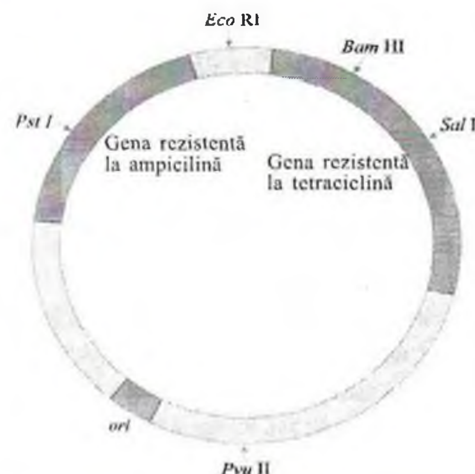


Figura 2.36a. *Plasmida pBR322: conţine 2 gene cu rezistenţa programată la tetraciclină (tet) şi ampicilină (bla)*

Fixîndu-se de membrană, interferonul stimulează sinteza enzimelor specifice, care-s capabile să lezeze RNA - virale şi să inactiveze factorii de iniţiere a sintezei proteice în ribozomi. În 1980, în SUA a fost identificată şi separată gena interferonului leucocitar al omului, inclusă apoi în *E.coli* pentru a o sintetiza în cantităţi substanţiale.

Se preconizează ca celulele modificate prin metoda ingineriei genetice să fie inoculate şi în organismul uman. Se procedează la încorporarea genelor funcţionale în locul celor defectate sau pierdute de organismul

uman, ca metodă de tratament - *genoterapia.*

Adaosul de material genetic este eficient cînd defectul constă în insuficienţa sau lipsa completă a unei proteine. Nu se consideră raţional cînd mutaţia conduce la surplus de proteine sau sinteza unor substanţe nocive precum are loc la anemia falciformă. Corecţia unor atare tulburări necesită nu numai încadrarea unei gene funcţionale, dar şi a unei gene capabile să inactiveze gena mutantă. Savanţii studiază posibilităţile inoculării genei funcţionale în celulele separate ale pacientului, reincluse apoi în organism. Sperăm că în viitorul apropiat va deveni posibilă tratarea bolnavilor prin metoda integrării genelor legate cu substanţe, ceea ce ar permite o fixare directă a genei în celulele-ţintă. Azi integrarea în genom a genei dorite e nesemnificativă — o celulă la 10^{3-6}. Se constată că integrarea în genom nu e întotdeauna necesară la expresia genei, doar e limpede că gena integrată se va păstra mult mai mult în celulă. Apoi ea e aptă de a se replica cu DNA cromozomial, se va transmite la alte generaţii de celule şi va determina sinteza produsului în decursul vieţii pacientului.

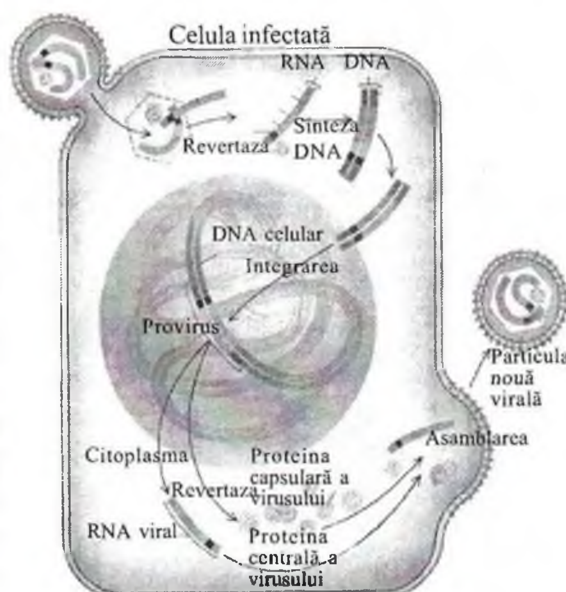


Figura 2.37. ***Ciclul vital al retroviruşilor***

Pentru încorporarea genei se utilizează capacitatea naturală a viruşilor de a pătrunde în celule şi de a-şi aduce materialul genetic propriu. Cel mai promiţător sistem de transfer al genelor în celule o prezintă *retroviruşii,* ei sunt vectorii cardinali, dar tot ei sunt capabili să se includă în DNA cromozomial al celulelor apte de reproducere activă. Un minus extrem de mare comportă pericolul provocării cancerului şi, deci, apare o sarcină importantă — posibilitatea de a stopa reproducerea acestor viruşi. În figura 2.37 e redat ciclul vital al retroviruşilor.

S-a elaborat o metodă efectivă de recepţionare a retroviruşilor, care posedă atît o membrană externă normală, cît şi toate proteinele virale. Însă RNA viral nu conţine informaţie de sinteză a acestor proteine şi locusurile secvenţei nucleotidelor corespunzătoare sunt ocupate de gena ce are a fi introdusă în celulă (fig. 2.38).

Dacă bolnavului i se integrează celule proprii ale sistemului imun preventiv, cultivate şi prelucrate cu *interleukina-2,* se produce pătrunderea limfocitelor în tumoare, se înregistrează regresia celulelor cancerigene. Din 15 bolnavi trataţi (după Rozenberg), la 9 (melanomă în stare gravă) s-a stabilit regresie vădită, la unul - completă.

În apropierea de Edinburg există o stînă cu oi transgenice (100), laptele cărora conţine o cantitate suficientă de proteine ce favorizează coagularea sîngelui. Laptele acestor oi e suficient pentru toţi bolnavii de hemofilie din Europa.

La Institutul de Fiziologie din Cambridge se experimentează nişte purceluşi neobiş-

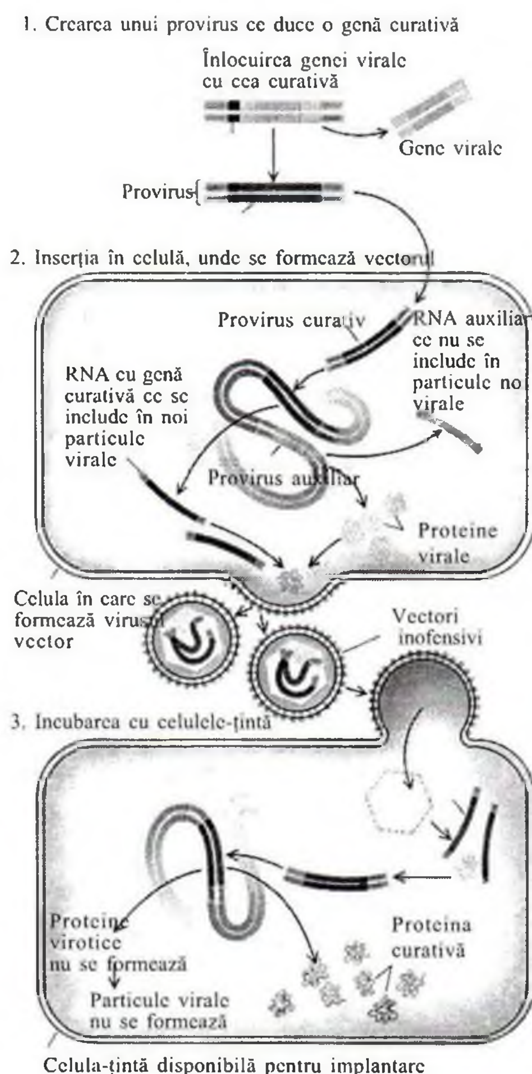


Figura 2.38. ***Vectorii retrovirușilor inofensivi se formează în celule***

nuiți. Lor li s-au introdus gene ce codifică hormonul somatotrop al animalelor mari cornute folosit în tratamentul diverselor patologii ale omului.

În baza investigațiilor efectuate, americanii au obținut porci ce cresc foarte repede, iar carnea lor n-are slănină. Aceste animale sunt slab rezistente la temperaturi joase. S-au căpătat cartofi foarte rezistenți la frig etc.

În perspectivă se va modifica și stomatologia: se concep dinți naturali în caz dacă gena omului va fi introdusă în genomul bacteriilor care vor sintetiza dinții respectivi.

Deocamdată transferarea mai multor gene e imposibilă, deoarece organismul nu recepționează mai mult decît o singură genă. Savanții modifică forma și dimensiunile multor animale. Se poate schimba și omul. Lui i se pot conferi proprietăți noi, pozitive, dar și dimpotrivă — negative. E un domeniu interzis de experimentări. Azi nu sunt cunoscute genele ce determină capacitățile mintale, dar unele informații referitoare la omul bolnav sunt elucidate. Includerea genelor ar modifica vădit armonia organismului uman.

La Institutul de Studii Biomedicale de pe lîngă Universitatea Washington, din 1991 se studiază tripanosoma, un microorganism ce parazitează în organismul omului și al animalelor.Savanții examinau proteina Co (III) și mRNA respectivă. RNA s-a descoperit, dar gena — nu. Însă copie fără original nu există. După analogie cu organismele înrudite, au stabilit DNA care potențial ar trebui să conțină gena și au comparat-o cu RNA inițial. S-a dovedit complementară după toate bazele, cu excepția U. Gena exista, dar RNA era modificată cam de 60%. S-a constatat că asemenea modificări nu sunt un original, fiindcă se înregistrează și copii precise.

Care este, totuși, cauza? Se consideră că în celulă are loc o transferare efectivă a informației de pe DNA, ulterior, un redactor face unele corecturi în textul mRNA. direcționat specific. Evident că în gene, copiile cărora se corectează inițial, lipsește semnalul de asamblare a proteinei. Rezultatul redactării e apariția lui în mRNA.

astfel proteina poate fi sintetizată. Redactorul ştie ce face. Acelaşi lucru s-a stabilit şi la speciile superioare. Funcţia respectivă o îndeplineşte *RNA de corecţie*, care nu numai că determină locul inciziei nucleotidelor, dar şi prezintă materialul respectiv. Enzimele favorizează acest proces datorită prezenţei unei gene informative (1991). Principiul transmiterii mesajului genetic se complică întrucîtva (fig. 2.39).

Metoda ingineriei genetice e utilizată pentru crearea vaccinei contra SIDA, maladie provocată de o familie de viruşi ce conţin RNA. Viruşii posedă revers transcriptaze şi sunt foarte instabili. Sistemul imun reacţionează la proteinele superficiale ale virusului care se modifică permanent, modificări legate de deriva genei. Pentru crearea vaccinei e folosit virusul variolei — ca vector —, incluzîndu-se gena SIDA.

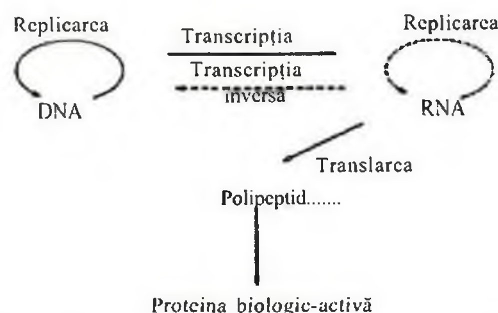


Figura 2.39. ***Dogma de transmitere a informaţiei genetice***

Moss a obţinut o atare vaccină. La maimuţe apar anticorpi, dar rămîn neprotejate de SIDA. Efectul imun e de faţă, însă nu şi de protejare. Capacitatea de apărare este determinată de alte caracteristici ale antigenului. D.Zaguri a creat o vaccină pentru o altă variantă a SIDA, dar cu acelaşi impact. Pentru diagnosticul SIDA e utilizată metoda de amplificare enzimatică a genei SIDA. Se confirmă prezenţa virusului după o oră de infectare, dacă din 5000 de celule e afectată măcar una. După 12 ore de la contaminare, diagnosticul se confirmă la afectarea unei celule din 500.000. La tratamentul efectiv al SIDA contribuie *azidotimidina* şi 2'- 3' - *dezoxicitidina* — nucleozide ce inhibă revertaza virusului.

S-au sintetizat şi alte preparate asemănătoare după structură cu tranchilizanţii, ce sunt inhibitori activi ai revertazei la HIV- I şi nu la HIV-II (virusul african).

În omida fluturelui *Hyalophora cecropina* s-a descoperit o substanţă peptidică — cecropina B, ce lezează bacteriile şi infectează omida. Biochimiştii de la Universitatea din Louisiana (1990) au sintetizat un şir de peptide cu o structură identică, deosebindu-se după cîţiva aminoacizi. Una din aceste peptide are o forţă distrugătoare fantastică şi a fost numită Siva - 1 (după numele divinităţii indiene, ce nu-şi cruţa niciodată duşmanii).

Peptidele contribuie la formarea porilor intracelulari şi, în consecinţă, apa pătrunde în celulă, distrugînd-o. Siva-1 acţionează şi asupra membranelor celulelor mamiferelor, dar celulele nu mor, fapt determinat de prezenţa citoscheletului ce păstrează forma celulei. În celulele cancerigene şi în cele afectate de virusul SIDA citoscheletul e lezat. Secvenţa aminoacizilor din aceste peptide e identică cu fragmentele — semnale din fibrinogenul omului — proteină cauzată de stres, răni. S-a stabilit că aceste fragmente sunt mai efective decît Şiva-1, la distrugerea celulelor cancerigene. Aşadar, organismul uman în stare de stres elimină activ substanţe anticancerigene, antistresante şi, deci, este concludent că rezervele proprii ale organismului sunt deosebit de efective în lupta cu factorii nocivi, rezerve care necesită o studiere amplă şi profundă.

BIOSINTEZA PROTEINELOR

Mecanismul biosintezei proteinelor, cu diversitatea activității biologice, s-a impus drept problemă dintre cele mai dificile în istoria biochimiei. Azi, în temei, el este studiat, dar posibil că aceasta e o mică parte din acel întreg, care trebuie cunoscut. Evident, mecanismul biosintezei e unul din cele mai complexe procese în natura vie, implicînd conlucrarea a peste 300 macromolecule specifice, reprezentate de proteinenzime, diferite tipuri de RNA cu funcții distinctive. Sinteza, cu o complexitate vastă, decurge cu o viteză rapidă: pentru sinteza lanțului polipeptidic din 100 resturi de aminoacizi ribozomului *E. coli* îi sunt destule 5 secunde.

Sinteza în fiecare celulă conlucrează cu metabolismul. Procesul de biosinteză presupune traducerea limbajului de 4 litere al acizilor nucleici în limbaj de 20 de litere (aminoacizi) al proteinelor.

Baza cunoștințelor noastre de azi au fost cimentate de trei mari descoperiri ale anilor 50 din secolul precedent:

1. Paul Zamecnik (1950) stabilește că locul sintezei proteice e ribozomul.
2. Paul Zamecnik și Mahlon Hoagland (1957) au demonstrat că activarea aminoacizilor și adiționarea lor la tRNA e catalizată de aminoacil-tRNA-sintetaze.
3. Francis Crick a expus ipoteza transferului mesajului genetic codificat în acizi nucleici cu 4 litere în limbajul celor 20 aminoacizi, concluzionînd: tRNA îndeplinește funcția de adaptor — o porțiune racordează aminoacidul specific, iar alta identifică în mRNA o secvență mică de nucleotide ce codifică acest aminoacid.

Biosinteza proteinelor include 5 etape:

I. *Activarea aminoacizilor*. Procesul are loc în citozolul celulei, în care cei 20 aminoacizi adiționează la tRNA prin legătura esterică. Procesul e catalizat de enzime diferite numite aminoacil-tRNA-sintetaze. Ele sunt caracteristice fiecărui aminoacid și tRNA, corespunzător. Activarea are loc în anumite faze:

a) în centrul activ (CA) al enzimei decurge următoarea reacție:



$$AA + ATP + E \rightleftharpoons E\text{-}AAAdenilat + PP_i$$

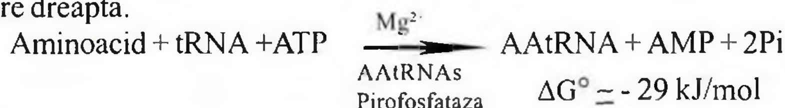
Legarea aminoacidului (COOH) are loc la gruparea 5'-fosfat a AMP din molecula enzimei.

b) Transferul de la E-AAA pe tRNA specific a restului de aminoacid:



$$E\text{-}AAA + tRNA \rightleftharpoons AAtRNA + AMP + E$$

Adiționarea aminoacidului are loc la grupele de OH în poziția 2' sau 3' a restului de adenozină în molecula tRNA (legătura e macroergică). Hidroliza ulterioară a pirofosfatului, sub acțiunea pirofosfatazei, face reacția ireversibilă — deplasează echilibrul spre dreapta.



$$Aminoacid + tRNA + ATP \xrightarrow[\text{AAtRNAs, Pirofosfataza}]{Mg^{2+}} AAtRNA + AMP + 2Pi \qquad \Delta G^\circ \simeq -29\ kJ/mol$$

Enzimele sunt foarte specifice — au 4 locusuri care participă la identificare, cataliză, posedînd capacitatea de autocontrol: 1) AA; 2) tRNA; 3) ATP; 4) HOH — ultimul e indicat pentru hidroliza aminoacidului "impostor". Specificitatea e determinată exclusiv de structura tRNA (1 eroare la 400 resturi de aminoacid).

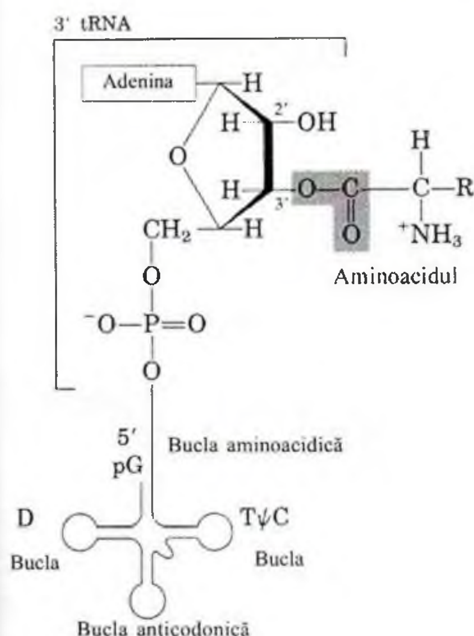
Siguranța procesului de traducere în mare masură e condiționată de capacitatea de autocontrol a sintetazelor. Activarea necesită ATP şi ioni de magneziu.

Deosebim 2 clase de aminoacil - tRNA-sintetaze:

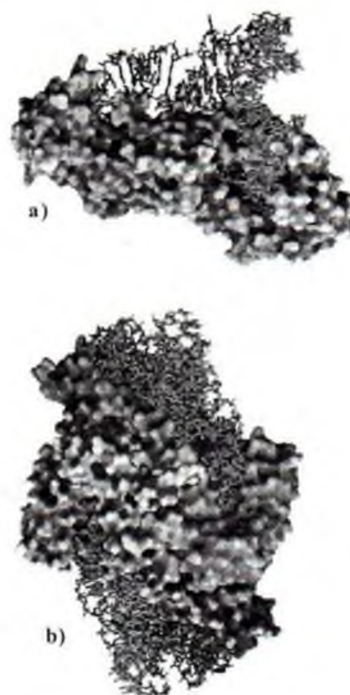
Clasa I - Arg, Cys, Gln, Glu, Ile, Leu, Met, Trp, Tyr, Val (OH-2' terminal tRNA).

Clasa II - Ala, Asn, Asp, Gly, His, Lys, Phe, Pro, Ser, Thr (OH-3' terminal tRNA).

Structura generală a unui aminoacil-tRNAs e redată mai jos. De asemenea sunt ilustrate şi conformațiile celor două sintetaze - tip I şi tip II.



Structura generală a AA -tRNAs



Aminoacil- tRNA sintetaza.
a)Gln -tRNAs, b)Asp -tRNAs

Sinteza lanțului polipeptidic începe cu capătul N-terminal, la care adiționează ulterior resturile de aminoacizi spre C-terminal. Aminoacidul inițiator la procariote este *N-formilmetionina*, la eucariote - metionina. N-formilmetionina se formează în două etape:

1. Met + $tRNA^{fmet}$ + ATP ⟶ Metionil-$tRNA^{fmet}$ + AMP + PP

2. N^{10}-formiltetrahidrofolat + Met-$tRNA^{fmet}$ ⟶ N-formilmet- $tRNA^{fmet}$ + FH_4 (tetrahidrofolat).

Reacția este catalizată de *transformilaza* specifică. Sunt 2 tRNA specifice la met-$tRNA^{met}$ şi N-formilmet-$tRNA^{fmet}$. Prima conduce la includerea metioninei în lanțul polipeptidic, a II - la legătura cu un anumit locus în ribozom.

II. *Formarea complexului de inițiere* decurge în 3 etape (fig. 2.40). Sunt necesare: 1) subunitatea mică a ribozomului; 2) mRNA ce codifică polipeptidul necesar; 3) N-fmet $tRNA^{fmet}$; 4) 3 proteine-factori de inițiere-IF-1, IF-2, IF-3; 5) GTP.

Etapa 1. Subunitatea mică leagă IF-3 şi previne reasociația subunităților ribozomiale. La subunitate adiționează mRNA astfel codonul de inițiere AUG se fixează într-un loc

specific al subunității. Fixarea lui corectă e determinată de un fragment al mRNA aranjat la cap 5' terminal adiacent codonului AUG (compus din 6-8 resturi de A și G). Acest fragment *Shine-Dalgarno* este perfect complementar cu o succesiune de nucleotide de la cap 3'-OH al rRNA 16 S (fig.2.41). Sensibilitatea ribozomului la semnalul de inițiere modulează viteza traducerii. Semnalul indică locul de fixare a N-fmet-$tRNA^{fmet}$.

Etapa 2. La complexul format adiționează IF-2 legat de GTP și fmet-$tRNA^{fmet}$, care se fixează în centrul peptidilic (P).

Etapa 3. Complexul interacționează cu subunitatea 50S, implicînd simultan hidroliza GTP pînă la GDP și Pi, care se elimină din complex. Părăsesc ribozomul IF-1, IF-2 și IF-3. În consecință, se formează complexul de inițiere, alcătuit din ribozomul 70S, funcțional activ, și mRNA, N-fmet-$tRNA^{fmet}$.

Fixarea corectă a ultimei e determinată de formarea perechii complimentare dintre tripletul anticodon și codonul mRNA cît ți de fixarea tRNA de locusul P al ribozomului.

Această etapă la eucariote este mult mai complexă și include o mulțime de factori (fig.2.42).

III. *Elongația lanțului polipeptidic*

Ea reprezintă un proces repetat. Pentru realizarea lui sunt necesare: complexul menționat deja, următorul AA-tRNA corespunzător tripletului ulterior al mRNA, trei proteine solubile citozolice, factori ai elongației — Tu, Ts, G și GTP.

Procesul decurge în trei faze:

a) Aminoacidul următor activ (AA_2-tRNA) se fixează cu Tu și GTP, formînd complex ce adiționează la complexul de inițiere. Simultan, are loc hidroliza GTP, rezultînd abandonarea complexului Tu-GDP de către ribozom.

Ultimul e reactivat cu GTP și Ts — în Tu-GTP. AA_2-tRNA se fixează de locusul aminoacidic datorită interacțiunii complementare antiparalele între anticodon și codonul

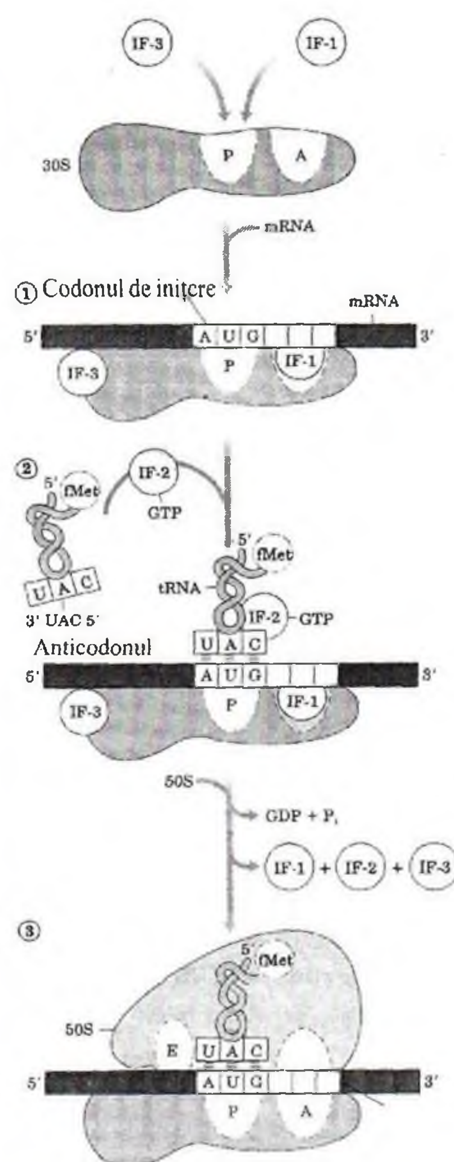


Figura 2.40. *Formarea complexului de inițiere*



Figura 2.41. *Segmentul complementar Shine-Dalgarno*

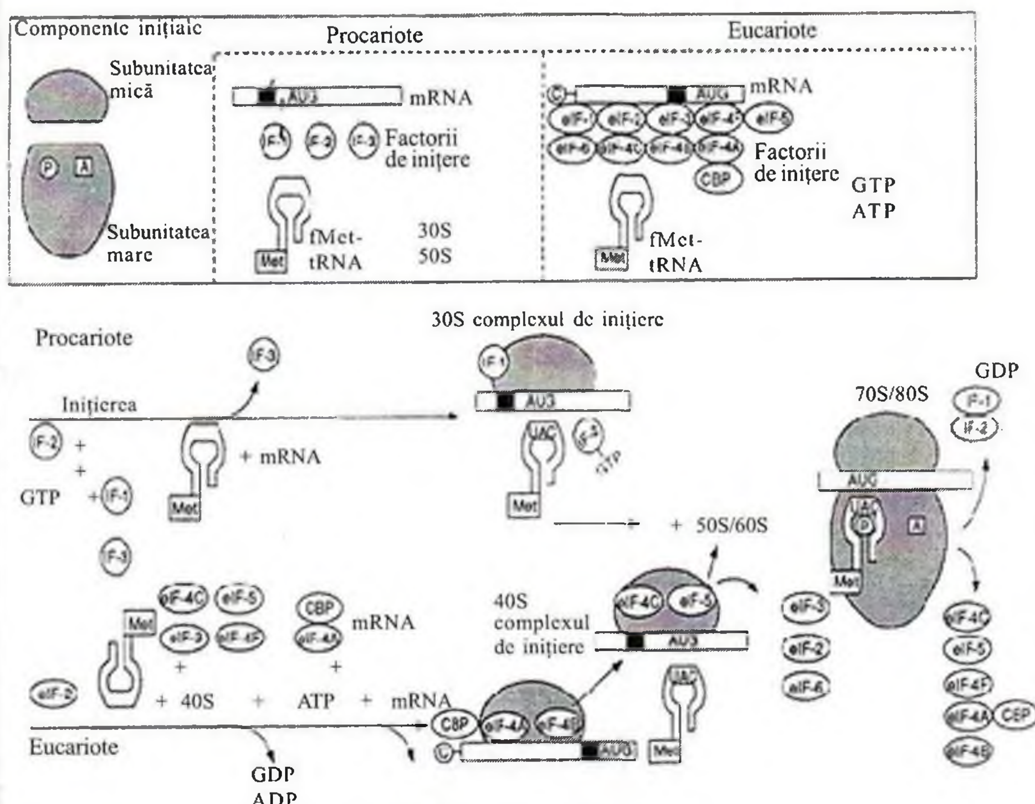


Figura 2.42. ***Formarea complexului de inițiere la pro- și eucariote***

mRNA. Fixarea adecvată e determinată și de interacțiunea în locusul A între tRNA și rRNA. S-a stabilit perfect că în bucla TΨC se localizează unele fragmente ce formează perechi cu bazele din 16S rRNA - la fixarea anticodonului. În 16S rRNA secvența C-C-A-A este complementară TΨC din tRNA (fig.2.10). Legarea se marchează numai după interacțiunea corectă dintre codon și anticodon — efect alosteric al fixării (fig. 2.43).

b) Elongarea continuă prin formarea legăturii peptidice între aminoacizi din locusurile P și A. Complexul de inițiere cu N-formilmetionina de la tRNA este propriu-zis transferat pe grupa aminică a noului aminoacid în centrul A. Reacția e catalizată de *peptidil transferază*, ce intră în compoziția subunității 50S și în final se formează dipeptidil-tRNA, iar în centrul P rămîne tRNA liber (fig. 2.44).

c) În faza următoare ribozomul parcurge pe mRNA spre capătul 3' o distanță egală cu un codon, cu transferarea dipeptidului tRNA în centrul P, iar tRNA (hidroliza liberă) abandonează ribozomul și se permută în citozol. În centrul A se află al treilea codon al mRNA. Mișcarea, alunecarea ribozomului se numește *translocare*. Procesul este catalizat de o *translocază* și presupune hidroliza unei molecule de GTP. Procesul e condiționat de existența factorului de elongare. În această fază au loc modificări conformaționale a întregului ribozom. El e gata de următorul ciclu de elongare.

La legarea în lanț sunt antrenate două molecule de GTP (fig. 2.44a).

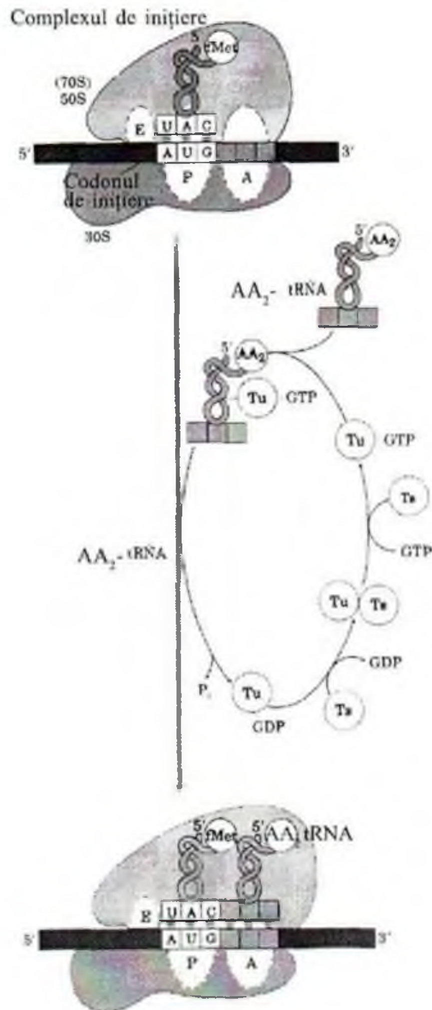


Figura 2.43. *Etapa I a elongării*

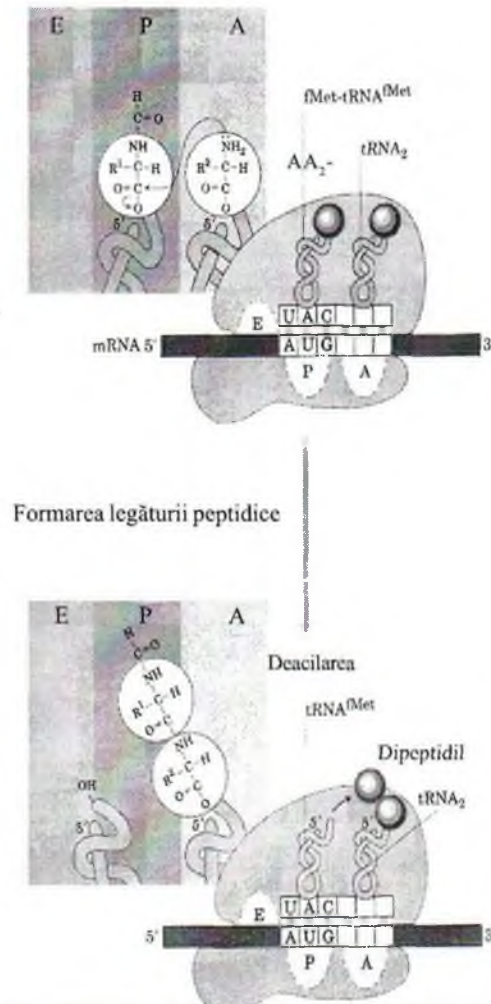


Figura 2.44. *Etapa II a elongării, formarea legăturii peptidice*

IV. *Finalizarea sintezei lanțului polipeptidilic* (fig. 2.44b). Procesul se oprește atunci cînd ribozomul întîlnește unul dintre codonii nonsens, ce semnifică finalizarea. În ansamblu, acționează și factorii de finisare — R_1, R_2 și S care efectuează următoarele operații:

a) detașarea hidrolitică a polipeptidului de la tRNA și eliminarea lui (hidrolaza);

b) eliminarea tRNA, purtător al ultimului aminoacid din locusul peptidilic;

c) disocierea ribozomului în subunitățile respective, apte să resintetizeze un alt lanț polipeptidic.

Biosinteza proteinelor cere un consum substanțial de energie — minimum 4 legături macroergice sunt necesare pentru formarea unei legături peptidice, ce asigură ireversibilitatea procesului și stabilitatea lui. Lanțul de mRNA poate reține mai mulți ribozomi împreună, formînd *polizomi* ce accelerează considerabil sinteza și eficacitatea matricei (fig. 2.45).

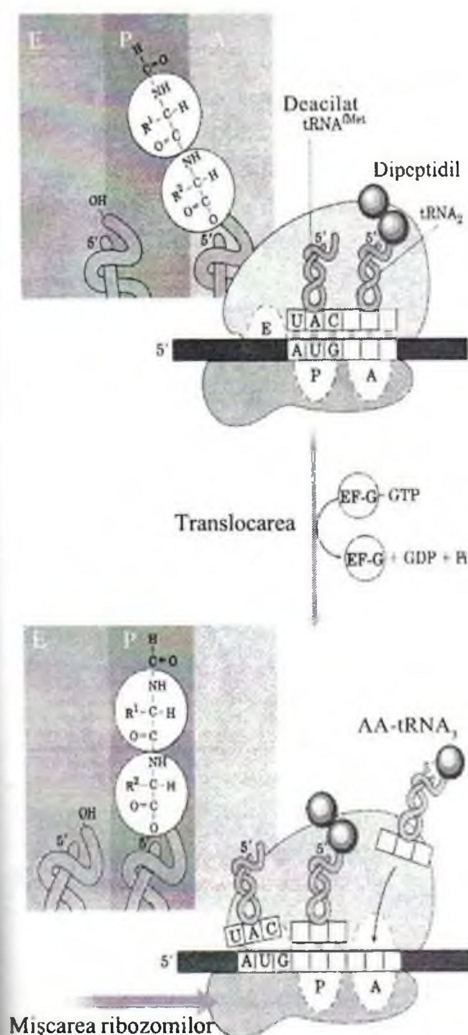


Figura 2.44a. *Etapa III a elongării, translocarea*

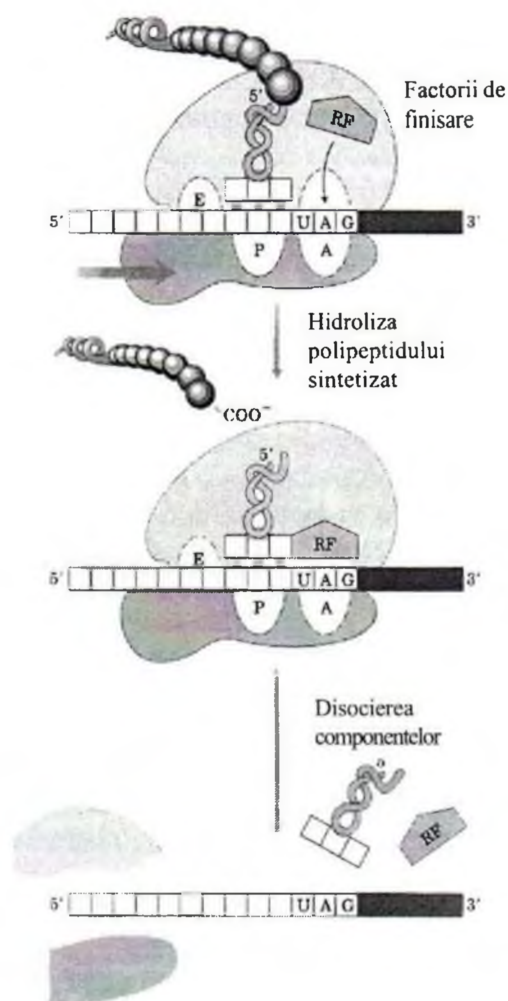


Figura 2.44b. *Finalizarea sintezei proteinei*

Dacă sinteza proteinei nu e necesară, nucleazele deprimă mRNA.

În procesul de sinteză sau imediat după ea, proteina se autoasamblează, formînd conformația nativă — structura tridimensională. Probabil lanțul polipeptidic sintetizat suferă modificări covalente, numite *modificări posttranslaționale* (prelucrări posttraducere — faza V), ce constau în:

1) modificarea capătului N- și C- terminal, N - mai frecvent se acetilează;

2) îndepărtarea secvenței semnalizante cu ajutorul unor peptidaze;

3)atașarea unor grupări funcționale — fosfat, biotin, glicozil — pentru formarea fosfoproteinelor, carboxikinazelor, glicoproteinelor etc.;

4) clivarea unor oligopeptide (preproinsulina);

5) metilarea (lizina în mușchi); iodurarea reziduului de tirozină în tireoglobulină;

6) carboxilarea (în protrombină a acidului glutamic);

7) formarea punților disulfidice;
8) modificarea unor aminoacizi lipsiți de cod (hidroxiprolina, hidroxilizina etc.).

În ce mod proteina sintetizată se localizează în celulă?

La capătul N-terminal se păstrează secvențe specifice- lider — 15-30 de aminoacizi. Ei sunt sintetizați în primul rînd și sunt identificați de locusurile receptoral—specifice de pe suprafața exterioară a reticulului endoplasmatic adiacent sintezei complete. Această porțiune-lider, de obicei, e hidrofobă, liposolubilă, ușor pătrunde prin membrană în interiorul cisternelor reticulului endoplasmatic și trage după sine restul lanțului. Ideea originală îi aparține lui George Palade, laureat al Premiului Nobel, original din Moldova.

În cisterne, o peptidază specifică o clivează. Proteina matură în aparatul Golgi este incapsulată, apoi părăsește celula în forma unei bule secretoare (fig. 2.45a).

În ultima perioadă se postulează două concepții de asamblare a proteinelor în forma nativă, structură unică trispațială: *cotranslațională* și *posttranslațională*. Conform concepției cotranslaționale, proteinele se aranjează spațial în procesul sintezei lanțului polipeptidic în ribozom, iar potrivit concepției

Figura 2.45. ***Polizomi***

Figura 2.45a. ***Compartimentalizarea proteinelor în reticulul endoplasmatic***

posttranslaționale – forma nativă apare numai în urma eliberării complete a lanțului polipeptidic din ribozom.

Sunt rezultatele unor experimente biochimice in vivo și pe sisteme-model, care confirmă conceptul cotranslațional de asamblare.

De regulă, foldingul proteinelor are loc în compartimentele corespunzătoare ale celulei – mitocondrii, reticulul endoplasmatic, citozol ribozomial. Proteinele penetrează mai multe membrane în calea spre locul de asamblare. Unele se pot asambla alături de membranele corespunzătoare.

În citozol și în plasma organitelor celulare, unele proteine se asamblează cu participarea *complexului ciaperonic*.

Azi se pot evidenția trei cazuri de asamblare a proteinelor, în dependență de localizarea acestui proces: lîngă ribozom, în apropierea membranei sau cu participarea ciaperonilor.

Asamblarea proteinelor lîngă ribozom. Știm că lanțul polipeptidic părăsește ribozomul într-un anumit mod: începînd cu capătul N-terminal și, consecutiv, parcurge, segment după segment, lanțul din centrul polipeptidilic — prin canalul ribozomial îngust — spre suprafața ribozomului, cu ieșirea cotraslațională în citoplasmă.

Dacă lanțul polipeptidic nu are secvența-lider, el nu este transportat și se asamblează în citoplasmă lîngă ribozom. În ce constau mecanismele de asamblare, ce reprezintă acest model? Asamblarea începe cu momentul translocării primului rest terminal-N al lanțului din ribozom în citozol (de la acest moment au loc modificări conformaționale sub influența forțelor moleculare, ce cauzează asamblarea proteică). În continuare, asamblarea are loc simultan, cu translocarea lanțului, și se finisează după ieșirea ultimului C-rest terminal din ribozom.

- Asamblarea are loc în etape consecutive, analogice cu ciclurile de translocație a lanțului din ribozom. Numărul de etape e identic cu fenomenul de translație la sinteza lanțului.

- La fiecare etapă se formează o conformație a capătului N-terminal al lanțului ce iese din ribozom. Aceasta este o structură inițială în formarea conformației unui lanț mai lung în etapa următoare a foldingului (are loc scindarea unor legături moleculare, cu formarea altora).

- Elementele de structură secundară (α – spațial, β – lanț, domeniile) formate în fiecare etapă a foldingului se distrug, se modifică sau pot rămîne nemodificate în etapa următoare.

- Formarea unei conformații a lanțului sintetizat la toate etapele foldingului, precum și a conformației native a proteinei la ultima etapă, durează nu mai mult decît este necesar ribozomului pentru realizarea unui ciclu de elongație. Durata foldingului este egală cu timpul sintezei lanțului polipeptidic de ribozom.

Sunt propuse și cîteva concepții referitoare la mecanismul asamblării *cotranslaționale*:

a) e determinată de viteza de translație a diferitelor segmente ale lanțului polipeptidic;

b) e determinată de viteza de translație a diferitelor segmente din mRNA, cauzată de clasterele codoanelor rar întîlnite, cît și de codul degenerat;

c) altă concepție susține că modificările conformaționale temporare sunt determinate de "codoanele" aminoacizilor inițiatori și terminali pe suprafața α-spiralei.

Cu alte cuvinte: structura secundară, terțiară proteică nu e dependentă de resturile aminoacidice din lanțul polipeptidic.

Asamblarea lîngă membrană. Translocația lanțului polipeptidic prin membrană are loc prin canalul respectiv membranar şi coincide cu periodicitatea ciclului de elongație ribozomială. Se presupune că procesul de asamblare lîngă membrană pe partea opusă a organitelor celulare este analogic cu schema propusă la asamblarea proteinei lîngă ribozomi. Se consideră că regiunea suprafeței respective, unde are loc asamblarea lanțului polipeptidic în structura nativă, conține resturi de aminoacizi polari şi e foarte hidratată. Acest fapt protejează lanțul de interacțiune cu complexul translocațional proteic.

Schema propusă presupune că asamblarea proteinelor este un proces dinamic de autoorganizare a structurii spațiale a lanțului polipeptidic, ce încontinuu se alungeşte, în funcție de etapele de timp. În compartimentele celulei îndepărtate de ribozom, lanțurile polipeptidice se vor asambla posttranslațional, adică după finisarea sintezei lor în ribozom (cu excepția acelor proteine care se sintetizează în ribozomii alăturați la membrana reticulului endoplasmatic).

Conform acestei ipoteze, asamblarea cotranslațională a proteinelor indică faptul că asamblarea lanțului în structură nativă are loc simultan cu translocarea lui în locul de asamblare.

Foarte multe aspecte sunt neelucidate. Unele proteine, primar fiind native, pierd structura terțiară rigidă la interacțiunea cu membranele. Asemenea modificări suferă toxinele, diversele proteine de transport. Datele confirmă că membrana poate servi ca factor denaturant în celula vie, cauzat de prezența în membrană a sarcinii negative. Acest potențial electrostatic al suprafeței membranare manifestă o atracție a proteinelor din soluție, cauzînd micşorări locale de pH pe suprafața ei, cu formarea unui gradient de pH în microspațiu. Se consideră că acest fapt, în ansamblu cu micşorarea permeabilității dielectrice a mediului, poate transforma molecula proteică în stare denaturată cu proprietățile caracteristice *globulei în fuziune* — starea a treia termodinamică a moleculei proteice.

Una din caracteristicile moleculei proteice nenative este proprietatea ei majoră de asociere. În procesul de renaturare, proteinele sunt capabile să formeze asociații de intermediate.

Anionii sunt capabili să inducă în proteinele globulare, parțial denaturate, asociații, care se amplifică odată cu diminuarea conținutului de structură secundară.

Se consideră că asocierea proteinelor e o problemă cardinală în biomedicină şi biotehnologie, fiind cauza unor astfel de maladii ca: *boala Down*, *mieloma*, *cataracta*, *afecțiunile «prion»*.

În condiții extremale, adaptarea e cauzată de mutațiile la nivelul DNA şi al proteinei cu participarea unor grupe prostetice, care pot stabiliza atît starea nativă, cît şi intermediatele foldingului. S-a constatat experimental că:

a) glicozilarea majorează mult stabilizarea şi solubilizarea proteinelor;

b) glicozilarea nu modifică mecanismul foldingului şi al asociației proteice;

c) componenta glucidică, grație capacității solubilizante, protejează partea proteică de agregare termică, manifestînd un efect ciaperoninic.

În diferite situații extremale, datorită reglării sintezei polioxizii a compușilor, se produc concentrații locale mari ale grupelor glucidice, ce posedă efect de protejare. Asemenea fenomene sunt înregistrate la bacterii, plante și animale mici.

La plantele rezistente la secetă proteinele înviate sunt bogate în lizină, serină, treonină, ce joacă rolul de imitatori ai apei intracelulare, în condiții extremale.

Organismele pot anihila stresul prin neutralizarea aciditătii anormale sau echilibrarea concentrației mari de săruri, grație concentrației izoosmotice de substanțe corespunzătoare sau a mutațiilor respective. Organismele termofile și barofile sunt capabile de adaptarea celulelor cauzată de împrejurările extremale pe parcursul întregului ciclu vital. La hipertermofile limita creșterii optime este de 80-110°, presiunii hidrostatice — pînă la 120 mPa, pH - de 0-11. Hipertermitele posedă o strategie de protejare puțin cunoscută azi. Foarte puțin se cunoaște și despre degradarea hidrotermală a aminoacizilor. Degradării oxidante sunt supuse cisteina, metionina; dezamidării — asparagina și glutamina.

Ionii, cofactorii, metaboliții conjugați cu componentele neproteice modifică esențial stabilitatea proteinelor și denaturarea termică, ce poate fi permutată spre limita maximă — pînă la aproximativ 120°C.

Particularitățile biosintezei proteice la eucariote

Procesul biosintezei proteice la eucariote se desfășoară conform unui mecanism similar procariotelor, dar cu unele particularități:

a) Aminoacidul inițiator nu este N-formilmetionina, ci metionina.

b) Pe molecula mRNA, la eucariote, există un singur semnal de inițiere, reprezentat de 7-metil-guanozin trifosfat, legată printr-o succesiune de nucleotide metilate de codonul inițiator AUG; deci, mRNA la eucariote este *monocistronic*. Este singura succesiune de nucleotide AUG apropiată de 7-metil-guanosină care servește drept codon de inițiere; aceasta este posibil datorită exigențelor de legare a ribozomului. La procariote mulți mRNA sunt *policistronici*, codificînd sinteza a două sau mai multe proteine. Pe un astfel de mRNA există multiple semnale de inițiere, care vor codifica sinteza a tot atîtea proteine.

c) Ribozomul eucariot nu «sare» peste codonii terminali ca cel procariot. Și acest fapt pledează pentru caracterul monocistronic al mRNA la eucariote.

d) Viteza procesului de traducere este mai mare la eucariote; în plus, pentru creșterea eficienței traducerii, mai mulți ribozomi se angajează simultan în citirea mRNA, toți începînd citirea de la capătul 5'.

Asocierea mai multor ribozomi, ce traduc simultan aceeași moleculă de mRNA, se numește *poliribozom* sau *polizom*.

Inhibitorii sintezei proteinelor

Majoritatea toxinelor bacteriene se comportă ca inhibitori ai biosintezei de proteine. Acțiunea specifică a antibioticelor este incontestabilă. Aproape fiecare etapă a sintezei proteinelor e inhibată de un anumit antibiotic și această inhibiție se poate întîlni în orice moment al transferului de mesaj. S-au stabilit următoarele (vezi fig.2.46):

1. Streptomicina produce erori în reproducerea mesajului genetic; interferează în locul de inițiere, cu legarea fmet.-$tRNA^{fmet}$. De asemenea, neomicina, kanamicina, gentamicina produc erori în reproducerea codului genetic.

2. Mitomicina, acyclovir (același mecanism) împiedică separarea catenelor

complementare ale DNA, acidul nalidixic inhibă DNA helicaza (giraza), actinomicina D se leagă trainic de DNA, împiedică transcrierea.

3. Tetraciclina blochează A situs în ribozom (inițierea).

4. Eritromicina se leagă de subunitatea 50S și inhibă translocarea.

5. Puromicina blochează elongarea, e analoagă cu capătul 3'-OH al AA tRNA și formează peptidil puromicină, așa încît nu mai adiționează nici un aminoacid.

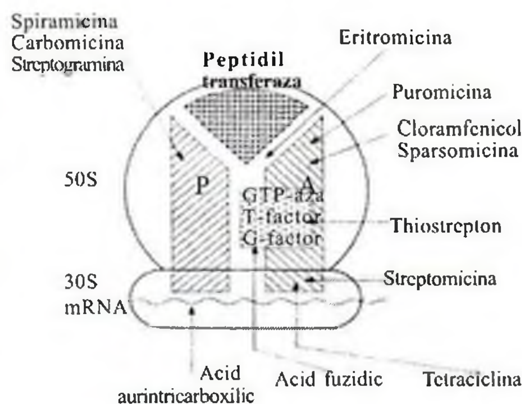


Figura 2.46. ***Site-urile de acțiune ale antibioticelor***

6. Toxina difterică inhibă translocaza.

7. Cloramfenicolul inhibă peptidil transferaza.

8. Ciclogeximida inhibă sinteza în ribozom 80S (translocaza).

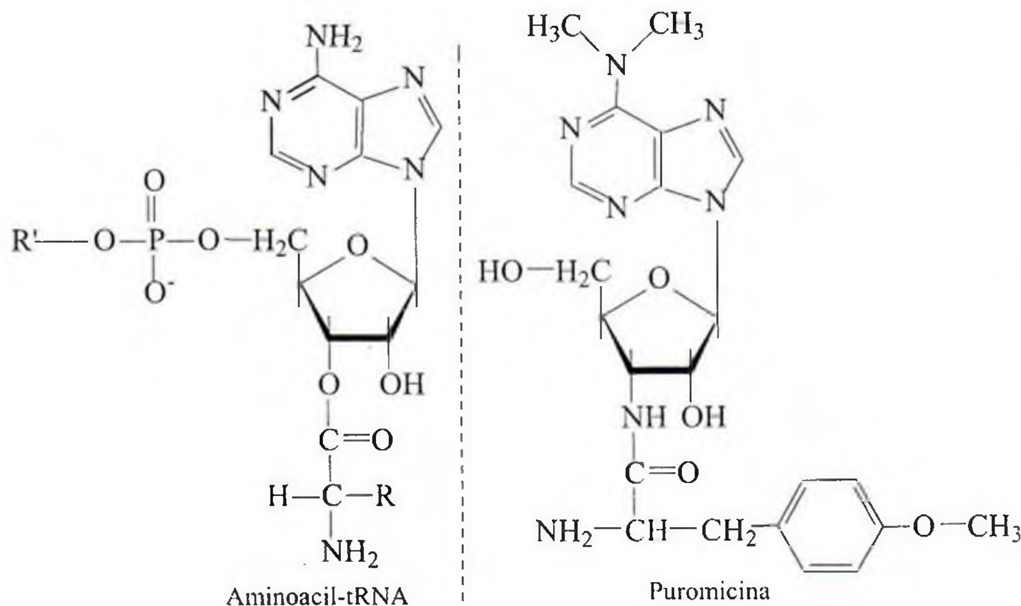
9. Tunicamicina inhibă atașarea catenelor oligozaharidice. Rifampicina și amanitina — s-au descris mai sus (RNA-polimeraza).

10. Spiramicina previne fixarea în site-ul P ribozomial.

11. Acidul fuzidic sechestrează G-factor și GDP în site-ul GTP-azei.

12. Acidul aurintricarboxilic previne fixarea RNAm în subunitatea 30S ribozomială.

13. Thiostreptona interacționează cu factorii G și T în site-ul GTP-azei.



REGLAREA BIOSINTEZEI PROTEINELOR

Grație procesului de reglare a sintezei, în celule se stabilește un complex adecvat de enzime ce asigură activitatea normală a fenomenelor celulare. Deşi fiecare celulă conține un set de genom caracteristic acestui organism, celulele lui exprimă numai o parte din genele structurale. Toate celulele conțin un set de enzime de bază, necesar pentru manifestarea metabolismului. Diferite celule, însă, conțin structuri proprii numai lor şi îndeplinesc anumite funcții biologice. Biosinteza diferitelor tipuri de proteine specializate sunt programate strict în timp şi consecutivitate, ceea ce permite o adaptare biochimică la acțiunea diverşilor factori.

Celulele dispun de trei tipuri de enzime: **1.** enzime inductibile; **2.** enzime represibile; **3.** enzime constitutibile. Ultimele se reprezintă în cantitate constantă, indiferent de starea metabolică a organismului (glicoliza). În alte celule reglarea e asigurată de cele inductibile şi se sintetizează numai atunci cînd este necesar, sub influența inductorului. Inductorul poate determina sinteza unui grup de enzime — inducție coordonată, ceea ce permite o adaptare imediată şi economă în utilizarea substanțelor nutritive. Concentrația enzimelor represibile depinde de prezența sau absența din mediu a unui compus denumit corepresor. Enzimele acestea sunt implicate în căile anabolice, cele inductibile, respectiv, în catabolice. Ne confruntăm şi cu *represie coordonată, represie prin produs final.*

Represia, ca şi *inducția*, e reflectarea principiului economiei celulare. Explicarea proceselor de inducție şi represie enzimatică se datorează lucrărilor lui F.Jacob şi J.Monod (1961) — *teoria lac-operonului* —, adică reglarea la nivelul transcripției .

Utilizarea lactozei la bacterii implică creşterea sintezei β-galactozidazei necesare pentru hidroliza lactozei cu scop energetic—, enzima codificată de gena Z. β-galactozidele (β-galactoza şi α-glucoza) sunt transportate prin membrana plasmatică printr-un proces cuplat cu gradientul de protoni. Proteina implicată în acest proces este β-galactozid permiaza cu o masă moleculară de 46,5 kDa; sinteza ei este codificată de gena Y. Unele β-galactozide sunt acetilate sub acțiunea transacetilazei, care vor traversa membrana plasmatică, ieşind din celula. Enzima este un dimer şi este codificată de gena A. Genele structurale care codifică sinteză celor trei enzime sunt controlate de alte două gene: gena reglatoare LacI şi gena operatoare O. Ultima, împreuna cu genele structurale, alcătuieşte operonul lactozei (Lac - operon) (fig. 2.47).

Gena reglatoare se află la distanță mică de operon şi determină sinteza unei proteine numită *represor*, care, legîndu-se de gena operatoare, împiedică transcrierea genelor structurale. *Inductorul* (metabolit) se leagă de proteina represor, modifică conformația, blocînd fixarea ei de gena operatoare. În acest caz are loc transcrierea genelor şi sinteza enzimelor codificate de ele.

Teoria modernizată constă în următoarele (fig. 2.47a).

În lipsa glucozei sau la concentrațiile mici ale acesteia (ca rezultat al activității adenilatciclazei şi inhibării fosfodiesterazei), apare *AMPc*, concentrația căruia creşte, reprezentînd astfel semnalul foamei pentru bacterii. În consecință, se formează complexul cu proteina receptoare, cu legarea acesteia de promotor (p-locus). Proteina receptoare e numită proteina activatoare a genei catabolice (*CAP*). Acest proces favorizează

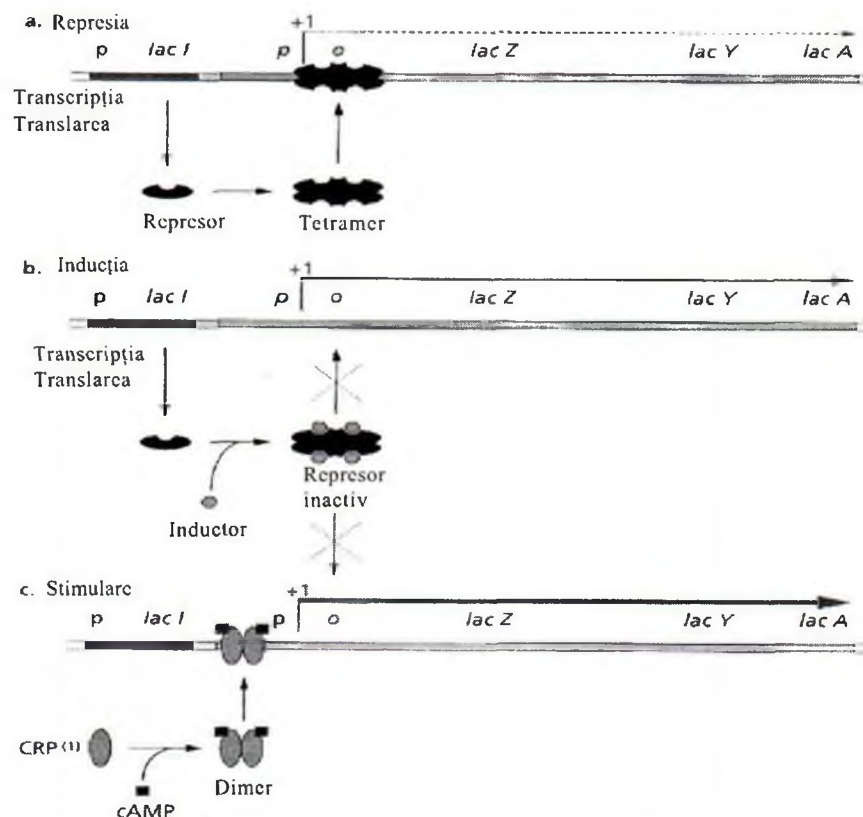


Figura 2.47. ***Reglarea activităţii Lac - operonului (CRP-protein receptor penru AMPc)***

pătrunderea RNA-polimerazei în locusul de reglare. CAP dispune de două centre pentru AMPc şi pentru DNA.

Proteina represor a fost izolată. Ea are două centre pentru a se lega de locusul operator şi de inductor. Atunci cînd concentraţia glucozei e mare, concentraţia AMPc e mică. Lipseşte şi complexul CAP-AMPc. În final, RNA polimeraza nu se leagă de promotor, iar genele Lac nu sunt transcrise, indiferent dacă există sau nu lactoza, adică indiferent de faptul dacă operatorul este sau nu ocupat de represor (fig. 2.47a).

Această dublă modalitate de reglare (de CAP-AMPc şi represor-inductor) conferă organismelor o mare flexibilitate metabolică, permiţîndu-le să-şi rezolve problemele de adaptare în diverse medii nutriţionale.

Promotorul e localizat în apropierea regiunii codificate. În anii 80 au fost depistate şi alte elemente reglatoare, denumite *e n h a n c e r s* (activatori), localizate la mii de nucleotide de la promotor sau regiunea codificată. Sunt depistate şi elementele reglatoare — *s i l a n c e r s*, care servesc ca inactivatori.

Posibil că astfel se reglează şi aceste structuri. Promotorii şi enhancersele sunt compuse din cîteva subiecte — secvenţe de nucleotide scurte care formează locusuri de fixare a proteinelor reglatoare. Proteinele se ataşează de subiecte bilateral simetric.

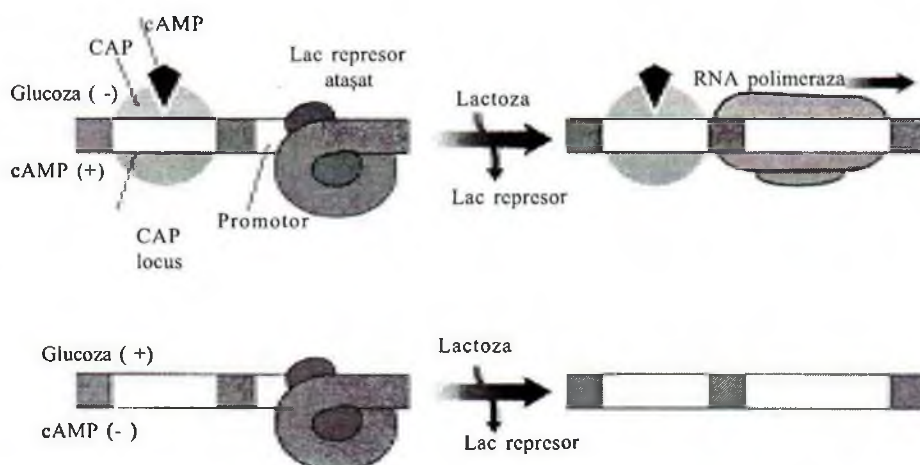


Figura 2.47a. ***Efectele combinate ale glucozei şi lactozei în expresia Lac - operonului***

Enhancers prezintă un puternic reglator pozitiv, efectul lui nu depinde de localizarea faţă de gena reglată. Fiecare genă poate avea unul sau mai mulţi enhancers.

Proprietăţile acestor elemente sunt:

1) cis-elemente active, numai dacă se află în structura anumitului DNA cu gena reglată;

2) n-are polaritate, direcţia sa poate fi reorientată, fără a diminua practic activitatea lor;

3) localizarea poate fi schimbată faţă de genă, mai des e precedentă lui, la sute sau mii de nucleotide. S-a determinat prezenţa lor şi în introni;

4) indiferent de gena pe care o reglează, schimbînd-o pe alta, o activează pe ultima;

5) posedă o slabă pronunţare de specie, însă în celulele sale acţionează mai efectiv;

6) mulţi îşi manifestă o exprimată specificitate de ţesut. Enhancers genei Hb sunt maximum activi în celulele eritrocitare; enhancers ale H — catenelor imunoglobulinei sunt activi în celulele limfocitare. Enhancers prezintă factori primordiali ai diferenţierii;

7) o genă poate avea mai mulţi enhancers;

8) enhancers sunt reglaţi de factorii celulari, de glucocorticoizi. Există mai multe secvenţe ce sunt identificate de receptorii glucocorticoizilor. Eliminarea lor inactivează enhancers, fapt argumentat la virusul cancerului glandei mamare.

9) hotarele enhancers nu-s strict delimitate, dar aflăm regiuni discrete, în care mutaţiile brusc micşorează activitatea. Aceste regiuni corespund unor zone omoloage între enhancers; spre exemplu, blocul izolat - activ (GCTGTGCAAAG). Se înregistrează şi alte zone conservative;

10) un enhancers are mai multe zone de acest tip premergător. Între blocuri se manifestă sinergismul în acţiune;

11) enhancers (unii) activează transcripţia genei, dar nu o menţin. Gena mutanţilor celulari ce au pierdut enhancers, îşi pierde activismul în alte celule. Activitatea se restabileşte numai dacă se ataşează enhancers corespunzători.

Silancers constituie elemente de control negativ, cu aceleaşi proprietăţi. Expresia genei va fi suficientă numai în cazul în care cu toate motivele în promotoare sau enhancers

se vor fixa proteinele corespunzătoare. De aceea, expresia genelor va fi pronunțată doar în acele celule care sunt apte de sinteza unui complet de proteine reglatoare, capabile să recunoască anumite motive. Se cunoaşte că albumina se sintetizează numai în hepatocite, însă celulele creierului, ale splinei conțin proteine care pot identifica elementele reglatoare ale genei de albumină, dar nu sintetizează albumina. Concluzia e unică: activarea genei e un proces mult mai complex.

S-a dovedit că proteinele ce se ataşează de DNA trebuie să corespundă după structură proteinelor fixate în vecinătate. Fiecare promotor şi enhancers este capabil să reacționeze cu cîteva combinații diferite de molecule proteice, dar numai o singură combinație activează gena. Proteinele reglatoare formeaza homodimere (perechi de proteine identice) sau heterodimere. Ultimele conferă organismului unele avantaje (identifică 2 secvențe nucleotidice diferite în acelaşi subiect de DNA) şi lărgeşte spectrul de reglare.

E argumentat şi faptul că activarea genei poate fi realizată de către fragmentele proteice reglatoare, care n-au nimic în comun cu locusurile responsabile de fixarea DNA - aceste domenii activatoare într-un mod anumit interacționează cu RNA-polimeraza. Domeniile active pot servi ca locusuri de contact cu alte proteine şi, în consecință, cercul de interacțiune se lărgeşte, îndeosebi la heterodimere.

În ce mod interacționează proteinele ataşate la DNA?

Parțial rezolvă problema aşa-numitele fermoare de leucină (fig.2.48 a, b, c).

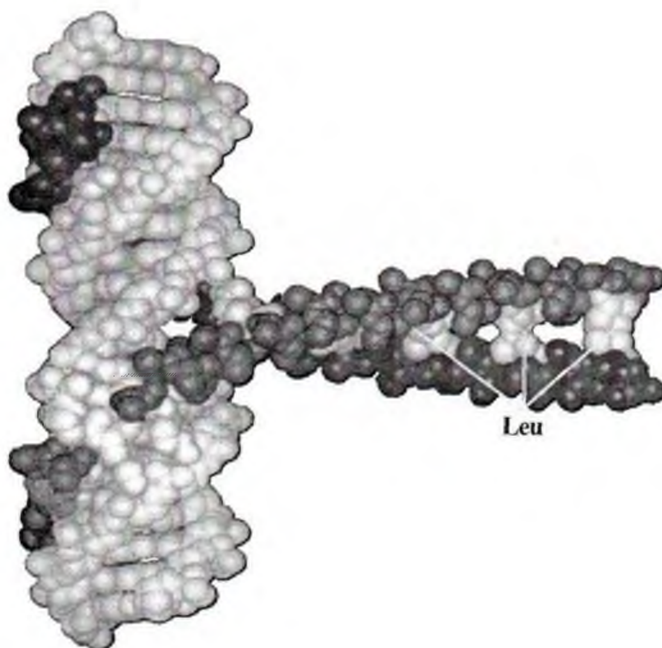


Figura 2.48a. ***Fixarea "fermoar" a două molecule proteice prin leucină. Ea favorizează fixarea proteinelor reglatoare cu DNA, modificînd activitatea genelor***



Figura 2.48.b. ***«Fermoarul» leucină (fiecare al şaptelea aminoacid) în α-elicea proteică***

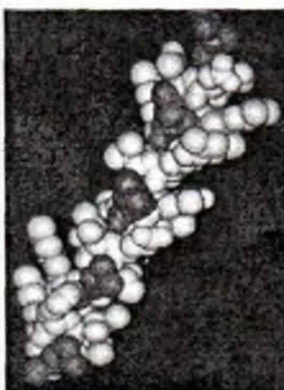


Figura 2.48c. *Modelul computerizat (imaginea mai închisă indică resturile de leucină)*

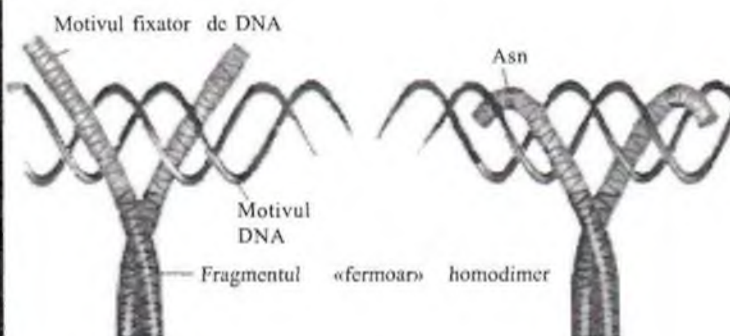


Figura 2.48d. *«Fermoarul» leucină contactează cu DNA, favorizînd fixarea. Asparagina și alți aminoacizi în aceste fragmente sunt invariabile*

În proteinele vizate aminoacidul al șaptelea este leucina — aminoacid hidrofob ce permite moleculei de proteină să se asocieze în perechi cu locusurile lor, formînd astfel dimere - superspirală. Fragmentele sunt aranjate paralel, ca-n colagen, determinînd duritatea spiralei. Pot asocia diferite proteine, dar la fixarea DNA nu participă.

În apropierea acestor fragmente sunt situate secvențe bogate în arginină și lizină, care contactează cu DNA. Poziția adecvată a fragmentelor de arginină și lizină, ce determină fixarea cu subiectele bilateral simetrice din DNA, este asigurată de asocierea a 2 molecule de proteine (fermoar (g)-piciorușul - fermoar; umerii-aminoacizi bazici). Spirala e deformată de asparagină, ce-i permite spiralei să contacteze cu DNA. Aceste fragmente au un grad mare de conservatism, un rezultat evident evolutiv și posibil relevă formarea heterodimerilor din proteinele neidentice (fig.2.48.d).

Reglarea fină a biosintezei proteinei e necesară pentru funcționarea normală atît a celulei, cît și a întregului organism. Generarea insuficientă sau excesivă măcar a unei proteine poate conduce la consecințe nefaste. Surplusul unor factori de evoluție provoacă malignizarea celulelor.

E clar că durata sintezei fiecărei proteine e direct proporțională cantității de mRNA. Factorii ce reglează cantitatea de mRNA, în final, determină și nivelul de sinteză a proteinei. Cantitatea de mRNA și proteină corespunzătoare din celulă era determinată, după presupuneri, numai de durata procesului de sinteză. Recent, s-a stabilit că un rol important îl joacă și durata de degradare a mRNA. Producerea proteinei depinde nu numai de intensitatea sintetizării mRNA, dar și de durata scindării lui.

Ce determină durata degradării mRNA?

mRNA degradează în citozol sub acțiunea enzimelor denumite *ribonucleaze*, care activează sub influența unor factori ce se fixează de moleculele de mRNA. Unul dintre factorii principali este structura lor proprie (fig.2.49.a,b).

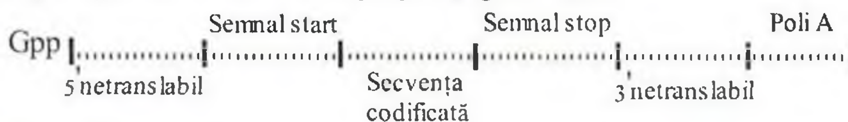


Figura 2.49a. *Molecula de mRNA*

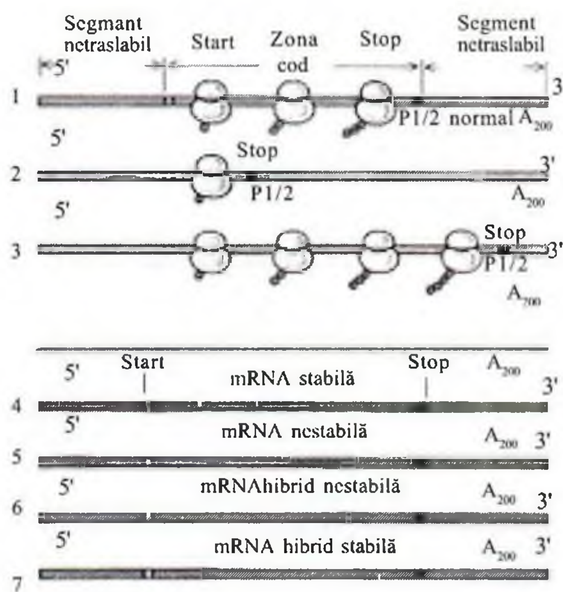


Figura 2.49b. ***Influența diferitelor porțiuni de mRNA la stabilitatea moleculei proprii. Modificînd poziția semnalului "stop", se mărește sau se micșorează zona codificată, ce conduce la majorarea P 1/2 mRNA, cu creșterea numărului de ribozomi fixați (2,3). Modificînd în mRNA stabilă cap.3 netranslabil cu fragmentul analog din 5, hibridul devine foarte nestabil (6) și invers, la modificarea în mRNA nestabilă (5) a segmentului 3 netranslabil cu cel din molecula stabilă, durata vieții e prolongată (7)***

Pentru sinteza proteinelor rolul primordial îl are secvența codificată, unde acționează ribozomii. Acest proces este influențat efectiv de celelalte fragmente.

a) Lipsa 5'-fragment netranslabil în gena C-myc (genă protooncogenă, ce codifică proteina necesară pentru mitoza normală. Dacă, însă, proteina e modificată sau e în exces, celula normală se malignizează) mărește perioada de înjumătățire (P1/2) a mRNA, generează surplus de proteină în celulele ganglionilor limfatici și fenomene de anomalie exprimate în celule cancerigene.

În 1984, K.Dani și F.Janter (Franța) au demonstrat că mRNA normal la transcripția genei e relativ stabil și are o perioadă de înjumătățire egală cu 10 minute. Tot ei au stabilit că în celulele cancerigene ale ganglionilor limfatici mRNA e mai scurt, fără segmentul 5'-netranslabil și, deci, au un P1/2 mult mai mare.

b) S-a dovedit că modificările din dimensiunule fragmentului de codificare a mRNA dereglează P1/2 și influențează mult degradarea mRNA.

c) S-a studiat P1/2 al mRNA la β și δ globine în celulele măduvei osoase a omului, gene ce codifică compartimentele proteice ale moleculelor din două variante de hemoglobină. S-a stabilit că mRNA la δ degradează de 4 ori mai rapid decît mRNA la β globină. Ele, însă, se deosebesc după fragmentul 3'-netranslabil. Savanții în materie din Cambridge (SUA) au determinat că viteza de degradație depinde de conținutul de adenină și uracil în acest segment. Cu cît e mai mare conținutul lor, cu atît mai rapid degradează mRNA.

d) Un anumit mesaj îl conferă și poli A. Se consideră că coada poli A trebuie să fie înlăturată anterior degradării mRNA. E posibil că nu singurul poli A, ci o proteină ligandă sporește stabilitatea mRNA. Această proteină (PABP) se racordează la coadă de 100 ori mai puternic decît la alte porțiuni de molecula mRNA. Anume această proteină stabilizează mRNA, durabil protejînd poli A de invazia ribonucleazelor (fig. 2.49c).

Este elocvent și faptul că în cadrul stabilității legăturii proteina poli A influențează și celelalte segmente ale mRNA. Prin urmare, nu numai fiecare segment influențează stabilitatea mRNA, ci, în unele cazuri, stabilitatea e determinată și de combinarea proprietăților acestor segmente, în ansamblu.

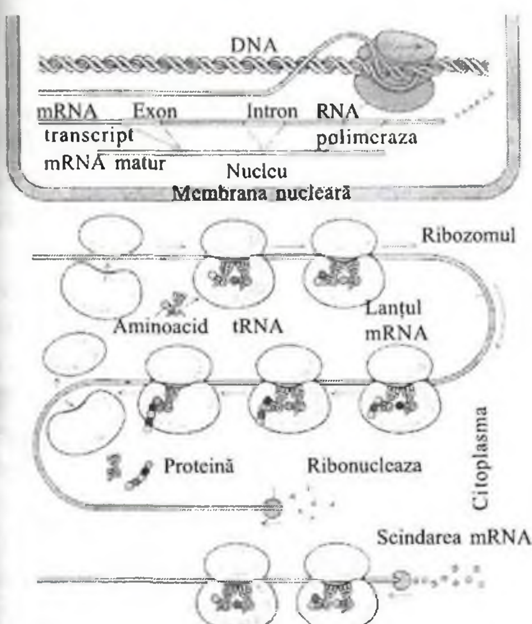


Figura 2.49c. *Ciclul vital al mRNA*

Dar care sunt mecanismele anume, mai concret va arăta viitorul.

Putem, totuşi, afirma că:

1. Stabilitatea mRNA depinde şi de viruşi. Ei grăbesc degradarea mRNA celulare, activînd ribonucleazele şi polizomii liberi, sintetizează proteine virotice proprii.

2. Estrogenii măresc stabilitatea, la fel ca şi hormonul de creştere, cortizonul etc.

3. În unele cazuri, proteina îşi reglează conținutul propriu al mRNA. Autoreglarea de tipul dat e descrisă la compartimentul sinteza histonelor (fig.2.49d,e).

Histonele libere, nelegate cu DNA, favorizează scindarea mRNA histonice, probabil legîndu-se cu fragmentul 3'-netranslator, care se scindează primul.

Histonele iau parte la activarea genelor, reglarea transcripției. Pentru inițierea transcripției e necesară o interacțiune directă sau indirectă a proteinelor activatoare, cu o porțiune din coada histonei H_4 pe TATA-bloc al DNA în promotor. Ca urmare, are loc o disociație menajată a octamerului histonic, prin detașarea histonelor H_2A şi H_2B.

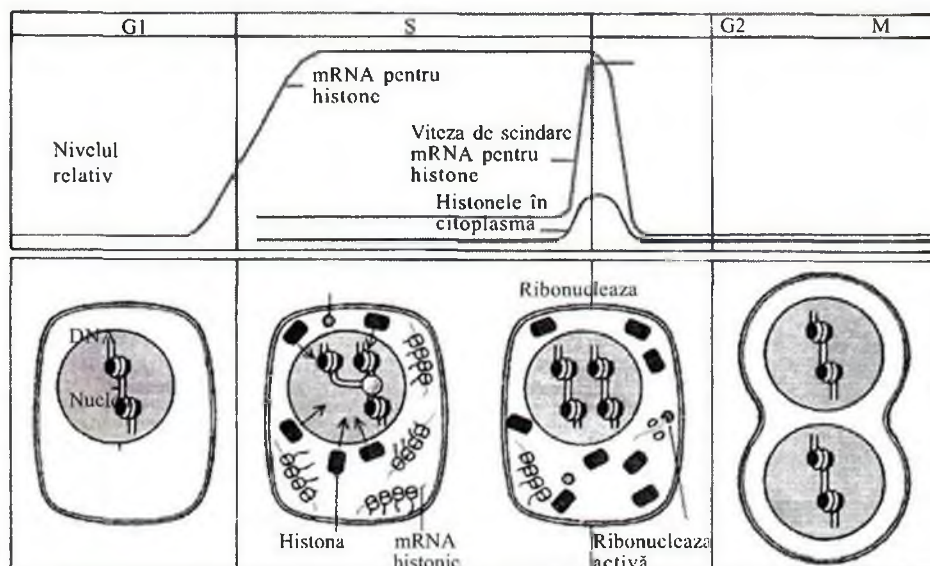


Figura 2.49d. *Ipoteza autoreglării conținutului de histone la diferite faze ale ciclului celular*

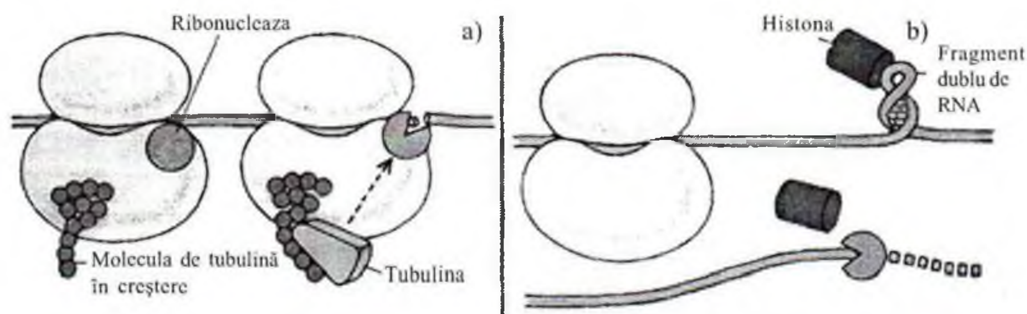


Figura 2.49c. *Mecanismul inducției lizei mRNA propriu de tubulină (a) și histone (b)*

În consecință, TATA-bloc e disponibil pentru asocierea cu factori bazali (inclusiv și RNA- polimeraza) și formarea complexului preinițial și începutul transcripției cu o viteză mică.

Sunt cunoscuți cîțiva factori sus-menționați, dar mecanismul de reglare a biosintezei proteinelor rămîne a fi, în multe cazuri, neclar. Cînd savanții vor putea modifica intenționat stabilitatea mRNA, posibil vom stăvili înmulțirea celulelor anomale, vom reduce sau complet vom suprima incidența cancerului.

În calea de la DNA la proteină, controlul se poate realiza, practic, la fiecare fază. Se remarcă următoarele puncte de control:

1) control la nivelul transcripției — timpul și caracterul transcripției genei respective;

2) control la nivelul procesingului — caracterul procesingului al transcriptului RNA primar;

3) control la nivelul de transport — selecția în nucleu a mRNA mature, menită exportului în citozol;

4) control la nivelul translației — selecția în citozol a mRNA, menită translării în ribozomi;

5) control la nivelul de degradație a mRNA — stabilizarea specifică a unor tipuri de mRNA în citozol.

Succesiunea proceselor în stabilirea concentrației de proteine, cît și punctele potențiale de control sunt redate în fig. 2.50.

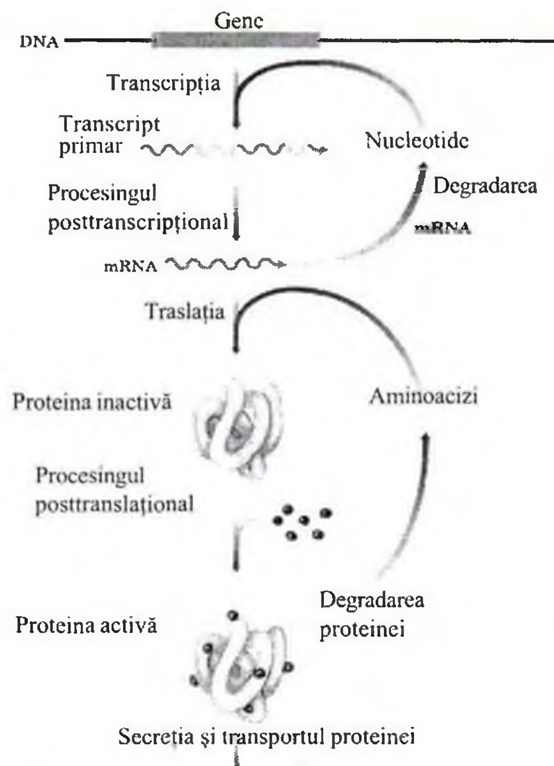


Figura 2.50. *Punctele potențiale de control în reglarea echilibrului proteic*

CAPITOLUL III. BIOENERGETICA

ASPECTE GENERALE

Întreaga biosferă desfăşoară o luptă continuă pentru menţinerea structurii proprii şi a funcţiilor inerente acestora. Pentru a exista şi a supravieţui, organismele vii se află într-un schimb permanent de energie cu mediul înconjurător.

Energia chimică a substanţelor nutritive, după transformarea ei într-o formă convenabilă, este utilizată pentru efectuarea de travalii specifice vieţii - creştere, reparaţii tisulare, activitate contractivă, osmotică. Organismele vii posedă dispozitive de transformare a energiei, deosebit de subtile şi eficiente.

Care sunt legile fundamentale ce guvernează procesele însoţite de schimbări energetice? *Ştiinţa care studiază transformările şi utilizarea energiei se numeşte **bioenergetică**.* Obiectul ei de studiu sunt sistemele termodinamice care constituie porţiuni din Univers, separate real sau imaginar. Ceea ce nu face parte din sistemul considerat (restul Universului), constituie mediul înconjurător. Între un sistem şi mediul înconjurător se efectuează schimburi de energie. Ca sisteme termodinamice pot fi cercetate (în cadrul schimbului de energie) atît indivizii unei specii, celulele izolate, cît şi reacţiile biochimice. Organismele vii sunt sisteme deschise, traversate de un flux de energie şi materie, adică o dată cu mediul înconjurător se schimbă atît substanţa, cît şi energia.

Termodinamica clasică studiază sisteme închise (nu pierd şi nu cîştigă nimic în cazul transformărilor ce le suferă). *Legile termodinamicii* (TD) sunt deduse din două principii fundamentale:

1. *Principiul conservării energiei* constă în faptul că energia Universului este constantă. Energia nu poate fi creată şi nici distrusă, e posibilă doar transformarea ei dintr-o formă în alta în cantităţi echivalente, energia nu se pierde.

2. *Principiul evoluţiei* stabileşte posibilitatea şi sensul transformărilor însoţite de schimburi de energie. Procesele asociate de transfer de energie se desfăşoară de la sine numai într-o direcţie şi numai pînă la o anumită limită (de exemplu, căderea unui corp; revenirea la iniţial a unui arc întins etc).

Care este factorul ce determină spontaneitatea unei transformări, de ce la o anumită limită procesul încetează?

Putem prevedea sensul şi limita desfăşurării libere a unui proces cu ajutorul ***entropiei*** (S), definită ca grad de dezordine a unui sistem. Ea reprezintă mişcarea dezordonată, haotică a particulelor, atomilor care alcătuiesc acest sistem. Cu cît libertatea de mişcare a acestor particule este mai mare, au o distribuţie mai dezordonată, cu atît entropia sistemului este mai mare. Moleculele organice complexe, proteinele, acizii nucleici sunt compuşi cu entropii mici. Celulele vii, organismele pluricelulare sunt de asemenea sisteme naturale cu entropii dintre cele mai mici.

Principiul al doilea al termodinamicii atestă că entropia Universului creşte. Ordinea se poate transforma spontan în dezordine. Însă procesul invers — diminuarea dezordinii — nu poate avea loc decît dacă sistemul absoarbe energie din mediu şi diminuează entropia. Ultima (S) poate fi măsurată (în calorii /grad/ mol.). Modificările

entropiei sunt greu de evaluat, de apreciat, în foarte multe cazuri. S-a definit o altă funcție termodinamică legată de entropie, care servește drept criteriu de manifestare liberă a proceselor — *energia liberă.*

Totalitatea factorilor (nucleul, electronii, rotația, translația, legăturile) determină ***energia internă (E)*** a sistemului. Energia internă a substanțelor simple nu se supune calculelor sau măsurărilor. Termodinamica operează cu valori ale modificărilor în cursul unor transformări pe care le suportă sistemul.

Avînd în vedere că reacțiile biochimice au loc în soluții apoase, în care variațiile de volum, presiune, T^0 sunt neglijate în cursul transformărilor, în bioenergie pot fi efectuate diferite simplificări ale modului de evaluare a schimbărilor energetice și sensului în care transformarea poate decurge liber, spontan. În reacțiile biochimice efectuate în condițiile sus-numite, modificările energetice sunt datorate exclusiv unor transformări intrinseci ale sistemului: formare sau desfacere de legături covalente, transfer de electroni, schimb de protoni, interacțiuni hidrofobe, formare de asociații intermoleculare etc.

Dacă în starea inițială sistemul a avut o valoare energetică egală cu E_1 și în final cu E_2, apoi diferența $E_2 - E_1 = \Delta E$ indică variația energiei interne a sistemului, modificările energetice totale ce însoțesc acest proces. Dacă ΔE este negativă, sistemul are energie internă, în final, mai mică. Dacă ΔE are valoare pozitivă, sistemul captează energie din mediu, în decursul transformărilor.

O porțiune din energia internă depinde de entropie și atestă produsul ei (S) și temperatura absolută (ST), aceasta fiind componenta energetică ce nu poate fi transformată în travaliu, în lucru util (la T constantă). Un anumit lucru înseamnă o mișcare ordonată, iar factorul TS este o energie de calitate inferioară, o energie degradată a sistemului. *Componenta energiei sistemului, convertibilă în lucrul util (la T^0 constantă) poartă denumirea de* ***energie liberă (G)***. E = G + TS. Rezultă că variația energiei interne (ΔE) într-o reacție este determinată de variațiile energiei sale libere (ΔG) și de variațiile entropiei (ΔS):

$$\Delta E = \Delta G + T\Delta S.$$

Reacțiile au loc spontan, cînd entropia sistemului în stare finală este mai mare, respectiv energia sa liberă scade. Orice reacție chimică sau proces are loc în sensul în care energia liberă a sistemului diminuează capacitatea sa de a efectua travaliul. Forța motrice a reacțiilor este tendința sistemului atît de a-și spori gradul de dezordine, cît și de a-și reduce conținutul de energie liberă, ordonată.

Energia liberă a unui compus depinde de cantitatea de substanță, ceea ce constituie o valoare extensivă. Energia a 2 molecule este de 2 ori mai mare decît a unei singure molecule. Energia liberă este o mărime aditivă: $G_s = G_a + G_b + G_c$.

Variația energiei libere într-o reacție în care un mol reactant s-a transformat într-un mol rezultant — fiecare în stare standard — poartă denumirea de ***energie liberă de reacția standard*** *și se notează cu ΔG^0*. Ea se calculează conform formulei:

(1) $\Delta G^0 = -2{,}303 \times R \times T \times \lg K; = -1{,}36 \times \lg K$

(R - *constanta gazului* = 1,987 cal/mol, T = 298°K).

Dacă: 1) Keq = 1, atunci $\Delta G^0 = 0$;
2) Keq >1, ΔG^0 este negativ;
3) Keq < 1, ΔG este o valoare pozitivă.
Keq = 10^{-1}, $\Delta G^0 = 1,36$; Keq =10, $\Delta G^0 = -1,36$.

Spre exemplu: în amestecul echilibrat G-1-P $\rightleftharpoons$ G-6-P concentrațiile sunt egale respectiv, cu Keq_1 = 0,001(1mM) şi Keq_2 = 0,019 (19 mM).

$$Keq = \frac{0,019}{0,001} = 19; \quad \lg 19 = 1,28.$$

$$\Delta G^o = -1,36 \times 1,28 = -1,74 \text{ kcal/mol}.$$

În concluzie, transformările G-1-P în G-6-P la concentrații inițiale de 1,0 mol decurg cu pierderea energiei libere.

Formula precedentă (1) ne permite să determinăm constanta reacțiilor în condiții standard (2):

lg Keq = $10^{-\Delta Go/(2,303\,RT)} = 10^{-\Delta Go/1,36}$. Dacă ΔG^o = - 1,36 kcal/mol, apoi Keq =10.

Aşadar, energia liberă standard şi constanta de echilibru a reacției sunt legate printr-o formulă simplă. Corelațiile dintre constanta de echilibru şi valorile modificărilor energiei libere standard ale reacțiilor chimice la T = 25°C sunt redate în tabelul de mai jos:

Keq	ΔG^o, kcal/mol	K'eq	ΔG^o, kcal/mol
10^{-5}	6,82	10	-1,36
10^{-4}	5,46	10^2	-2,73
10^{-3}	4,09	10^3	-4,09
10^{-2}	2,73	10^4	-5,46
10^{-1}	1,36	10^5	-6,82
1	0		

Valorile modificărilor energiei libere standard caracteristice unor reacții chimice sunt următoarele:

ATP + H_2O	→	ADP + Fosfat	ΔG^o = -7,3 kcal/mol
Glucozo-6-fosfat + H_2O	→	Glucoză + Fosfat	ΔG^o = -3,3 kcal/mol
Maltoza + H_2O	→	2Glucoză	ΔG^o = -3,7 kcal/mol
Lactoza + H_2O	→	Glucoză + Galactoză	ΔG^o = -3,8 kcal/mol
Glucozo-1-fosfat	→	Glucozo-6-fosfat	ΔG^o = -1,74 kcal/mol
Fructozo-6-fosfat	→	Glucozo-6-fosfat	ΔG^o = -0,40 kcal/mol
Malat	→	Fumarat + H_2O	ΔG^o = +0,75kcal/mol
Glucoză + $6O_2$	→	$6CO_2$ + $6H_2O$	ΔG^o = -686 kcal/mol
Acid palmitic + $23O_2$	→	$16CO_2$ + 16 H_2O	ΔG^o = -2338kcal/mol

Studiind biochimia, ar trebui să rezolvăm două probleme principale: 1) În ce mod celula recepționează energia şi capacitatea reducătoare din mediul ambiant şi 2) Cum celulele sintetizează blocurile de construcție — baza macromoleculelor?

În general, aceste procese au loc datorită prezenței unor sisteme superintegrate de reacții chimice denumite ***metabolism.***

METABOLISMUL

Metabolismul este o activitate celulară concordată, determinată de participarea multor sisteme multienzimatice strîns legate între ele.

Care sunt funcțiile metabolismului?

1. Aprovizionarea cu energie chimică, care se formează la scindarea substanțelor nutritive bogate în energie sau ca urmare a transformării energiei radiației solare.

2. Transformarea moleculelor substanțelor nutritive în blocuri de construcție necesare pentru sinteza macromoleculelor.

3. Asamblarea proteinelor, acizilor nucleici, polizaharidelor, lipidelor și a altor componenți celulari din aceste blocuri.

4. Sinteza și catabolismul biomoleculelor necesare pentru activitatea specifică a diferitelor celule.

Un organism simplu ca *E.coli* produce cel puțin o mie de reacții chimice diferite. Sistematizarea lor la prima vedere pare imposibilă, dar la o analiză mai profundă se dovedește a fi mult mai simplă — metabolismul reprezintă un sistem coordonat cu motivații comune. Numărul de reacții în metabolism e mare, dar numărul de tipuri de reacții e relativ mic.

Rolul primordial în toate formele vieții îi aparține unui grup de molecule, numărul total al cărora nu depășește 100. De remarcat că există mecanisme comune ale reacțiilor căilor metabolice. Cu alte cuvinte, căile metabolice centrale sunt reduse și identice aproape la toate viețuitoarele.

În procesul metabolismului o parte din energia captată se pierde, iar cantitatea energiei neutilizate crește. Căldura și alte forme de energie se emană în mediul exterior, trec într-o formă nesistematizată și inutilă pentru organismele vii. Torentul de energie în biosferă e un proces direcționat, neciclic, cheltuindu-se o energie anumită pentru activitatea în căile metabolice, deoarece energia utilizabilă nu poate fi regenerată din cea inaccesibilă, disipată. Și dacă elementele C, O_2 au rotațiile lor, sunt antrenate în cicluri noi, atunci energia utilă degradează încontinuu, se transformă în una inutilă.

Fiecare tip de celule se caracterizează printr-o solicitare specifică de sursele O_2, N, C, cît și de surse corespunzătoare de energie. Metabolismul celular e un sistem de modificări fermentative ale substanțelor și energiei provenite din produsele inițiale și pînă la biosinteza materiei vii. *Produsele intermediare a căilor metabolice sunt numite* ***metaboliți.***

La diferite etape au loc modificări chimice neesențiale — adiția, deleția, transferul atomilor, moleculelor, grupelor funcționale. În urma acestor modificări reglementate pe etape, molecula inițială se transformă în metabolitul rezultant. Unele căi metabolice se expun liniar, altele ciclic.

De obicei, căile metabolice au diferite ramificări, de unde circulă produsele reacțiilor. Într-un sens mai îngust, prin metabolism se subînțeleg transformările substanțelor în celulă de la momentul inițial pînă la formarea produselor finale. Evidențiem două faze ale metabolismului — *catabolism și anabolism.*

Catabolismul constituie faza degradării compuşilor preluaţi din exterior, a propriilor constituenţi ca rezerve — la compuşi simpli. Procesele catabolice sunt însoţite de degajarea energiei libere, încadrată în structura complexă a substanţelor organice. La o anumită etapă a procesului energia liberă se acumulează pe durată scurtă graţie reacţiilor fermentative cuplate în formă macroergică — ATP. Poate fi acumulată şi în intermediari (o parte) bogaţi în energie — atomii de hidrogen ai coenzimei NADP în stare redusă NADPH.

Anabolismul sau biosinteza este faza procesului de sinteză a diverşilor compuşi organici (proteine, acizi nucleici şi alte blocuri macromoleculare) constituiţi din mici blocuri de construcţie. Procesul necesită utilizarea energiei libere. Drept sursă serveşte scindarea ATP. Biosinteza solicită şi atomi de H, donatori fiind NADPH.

Catabolismul şi anabolismul decurg simultan în celule, însă viteza lor se reglează independent. Hans Krebs a descris trei etape de generare a energiei la oxidarea substanţelor nutritive. Aceste căi catabolice joncţionează, converg, dînd naştere unui număr redus de metaboliţi.

Etapele catabolismului aerob sunt următoarele:

a) Macromoleculele alimentelor se scindează în componente mici: proteinele în 20 aminoacizi, polizaharidele — în hexoze şi pentoze, lipidele — în acizi graşi şi glicerină. La această etapă nu are loc eliminarea energiei biologice utile.

b) În faza a doua, din moleculele primei faze (numeroase) se formează cîteva componente simple, ce joacă un rol primordial în structura metabolismului, şi anume piruvatul — un compus intermediar, ce se transformă în component acil al acetil-coenzimei A, ultimul încheind etapa a doua.

c) În etapa a treia, graţie ciclului acizilor tricarbonici şi fosforilării oxidative, ce finalizează căile de oxidare a moleculelor nutritive, se formează H_2O, CO_2, NH_3 (sau alte substanţe azotoase). Generarea energiei are loc, mai cu seamă, la această etapă. Căile catabolice, în fine, fuzionează fenomenul de convergenţă.

Anabolismul decurge la fel în trei etape, începînd cu moleculele mici de precursori. Spre deosebire de catabolism, căile metabolice la anabolism se ramifică (fenomen de divergenţă). Dintr-un număr mic de precursori se formează, în final, un complex de macromolecule de structură vastă.

Căile centrale conţin multe ramificări, facilitînd astfel sintetizarea a sute de componente, reacţiile biochimice fiind catalizate de sisteme multienzimatice. Succesiunea modificărilor chimice în aceste căi este în principiu identică la toate organismele vii. De exemplu, scindarea glucozei decurge în acelaşi mod la toate organismele.

Coincide oare direcţia căilor catabolice şi celor anabolice?

Datele confirmă că ea nu este identică. Or, acest factor e favorabil celulei?

Există cauze serioase ce determină necoincidenţa căilor metabolice:

1. Calea de scindare a biomoleculei poate fi incompatibilă cu cea de biosinteză din considerente energetice (e clar, dacă procedăm în analogie cu căderea unei pietre de pe munte şi intenţia de a o urca în vîrful lui). Calea de biosinteză necesită energie suplimentară, cheltuieli enorme.

2. Neidentitatea constă şi în faptul că succesiunea reacţiilor trebuie reglată separat. Dacă ar exista aceeaşi cale, ar avea loc o simplă inversare a succesiunilor de reacţii. Inhibarea catabolismului ar conduce şi la inhibarea proceselor anabolice. Pentru ca sinteza şi scindarea unei molecule să fie reglate independent, aceste căi trebuie să fie diferite. Dacă, însă, posedă faze fermentative comune, apoi viteza procesului este reglată de acele enzime care în cadrul succesiunii reacţiilor căilor contrare nu participă.

3. Este exclusă identitatea şi din motivul că diferă (cele antidirecţionale) şi după localizare (catabolismul acizilor graşi are loc în mitocondrii — biosinteza lor în citozol. În aceste structuri este situat un complet de enzime specifice).

Nefiind identice, căile menţionate sunt legate prin etapa a III-a ce include ciclul acizilor tricarboxilici şi fosforilarea oxidativă. Această etapă e numită *faza amfibolică* a metabolismului, îndeplinind un rol bifuncţional. Catabolismul finalizează cu scindarea şi formarea moleculelor relativ mici; anabolismul furnizează molecule mici — precursorii biosintezei.

Ciclul ATP. Reacţiile metabolice sunt indispensabile, constituind o reţea de reacţii fermentative corelate necesităţilor urgente ale celulei; decurg foarte econom, cu minimum consum energetic. În procesul de oxidare se elimină o cantitate enormă de energie nevalorificată, utilizată ulterior pentru îndeplinirea unui lucru la T şi P constante. Ea se fixează şi se conservează. Energia termică e necesară pentru menţinerea T constante a corpului. Sistemul universal de transfer al energiei în toate celulele vii este ATP - ADP şi P_i. O mare parte a energiei libere se păstrează în baza sintezei cuplate a ATP din ADP şi P_i.

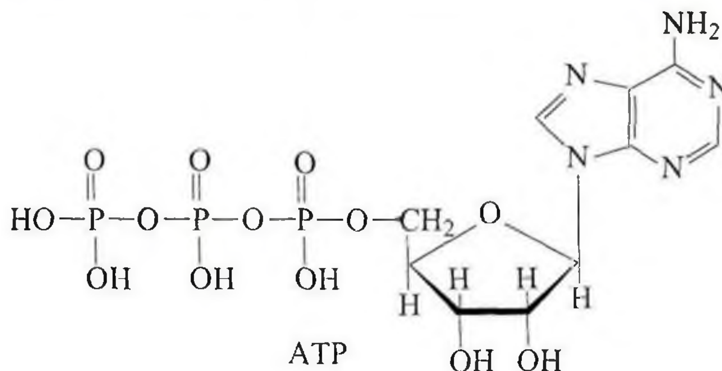
Energia chimică încorporată în ATP este utilizată drept:

1. Sursă de energie în mişcare, contracţie şi transfer de ingredienţi prin membrane contra gradientului de concentraţie etc.

2. Sursă de energie în biosinteză. Sub acţiunea enzimelor respective fosforul (P) terminal este transferat moleculelor mici, activîndu-le şi folosindu-le ulterior la asamblarea macromoleculelor.

3. Mobilizator al mecanismelor fine ce determină transmiterea informaţiei genetice.

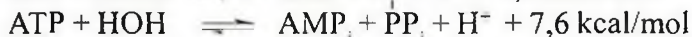
În reacţiile cuplate cu utilizarea energiei celulare ADP se încarcă. ATP joacă rolul de expeditor al energiei şi cuplează procesele active, cu eliminarea şi utilizarea energiei.



Fiind depistată ATP în extractul din muşchii scheletali, în 1929, de către K.Lohmann (Germania) şi C.Fiske, şi J.Subbarow (SUA), abia în 1941, Fritz Lipmann a înaintat conceptul care prevedea existenţa în celulă a ATP - ciclului, în care ATP joacă principalul şi universalul rol de remitător al energiei chimice. Prezenţa ATP, ADP, AMP este determinată la toate vietăţile şi îndeplinesc aceleaşi funcţii. Se conţin în toate compartimentele celulei, cota ATP fiind 80% din conţinutul total.

La hidroliza ATP, în condiţii standard, se elimină energie:


$$ATP + HOH \rightleftharpoons ADP + P_i + H^+ + 7{,}6\ kcal/mol$$


$$ATP + HOH \rightleftharpoons AMP_i + PP_i + H^- + 7{,}6\ kcal/mol$$


$$PP_i + HOH \rightleftharpoons 2P_i + H^+ + 6{,}9 kcal/mol \text{ (după alte date } (-7{,}3\text{-}8{,}0) kcal/mol)$$


$$ATP + 2HOH \rightleftharpoons AMP + 2P_i + H^+ + 14{,}6\ kcal/mol$$

Energia liberă constituie diferenţa dintre energia liberă a substanţelor iniţiale şi cea a produselor rezultante în condiţii standard (T = 298°K, P = 1atm., concentraţie = 1,0 mol, pH = 7,0). Se notează prin ΔG° — în cal/mol sau J (joule); 1cal = 4,184 J şi se calculează conform ecuaţiei descrise mai sus.

ATP este principalul donator al energiei libere în sistemele biologice, ceea ce nu egalează cu forma de rezervă a energiei. În celulă molecula de ATP se utilizează timp de un minut după sinteza sa. Omul în repaus utilizează în 24 ore circa 40 kg de ATP; la exerciţii intensive viteza utilizării de ATP ajunge la 0,5 kg/min. Turaţia ATP e foarte mare.

Unele reacţii biosintetice sunt iniţiate de către alte nucleotide, în care GTP, UTP, CTP servesc drept furnizori de energie.

La hidroliza unor compuşi fosforilaţi se elimină mai multă energie liberă decît la scindarea în condiţii standard a ATPului:

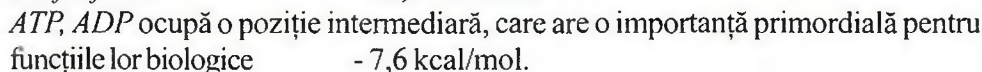

fosfoenolpiruvatul - 14,8 kcal/mol


carbamoilfosfatul - 12,3 kcal/mol


3-fosfogliceroilfosfatul - 11,8 kcal/mol


creatinfosfatul - 10,3 kcal/mol


acilfosfatul - 10,3 kcal/mol


ATP, ADP ocupă o poziţie intermediară, care are o importanţă primordială pentru funcţiile lor biologice - 7,6 kcal/mol.


AMP - 3,4 kcal/mol


G-1-P - 5,0 kcal/mol


G-6-P - 3,3 kcal/mol


F-6-P - 3,8 kcal/mol


GA-3-P - 2,2 kcal/mol

Ocupînd acest loc în scara termodinamică, ATP serveşte la remiterea grupelor fosfat de la *substanţele supermacroergice* la acceptorii de fosfat, compuşii cărora se caracterizează prin valori mici de ΔG° la hidroliză. În procesele de catabolism se formează substanţe supermacroergice (X - P). Cu ajutorul enzimelor specifice din grupa kinazelor grupa fosfat este transferată la ADP, cu formarea ATP.


$$X - P + ADP \rightarrow X + ATP$$

La etapa a doua, o altă kinază specifică transferă P terminal din ATP pe molecula acceptorului de fosfat (Y), mărind energia lui.



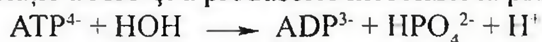
$$ATP + Y \longrightarrow ADP + Y - P.$$

ATP îndeplineşte funcţia de remitător al energiei chimice, deoarece celula nu conţine kinaze specifice, ce ar transfera grupa fosfat de la substanţele supermacroergice la acceptori.

Ce particularităţi determină molecula de ATP, la hidroliza fosfatului terminal, să elimine energie?

Efectul e determinat de trei factori structurali:

1) gradul de disociaţie a ATP şi a produselor hidrolizei la pH = 7,0



$$ATP^{4-} + HOH \longrightarrow ADP^{3-} + HPO_4^{2-} + H^+$$

— ionii de hidrogen deplasează reacţia de hidroliză spre dreapta;

2) repulsia electrostatică: cele 4 sarcini negative sunt situate foarte aproape în spaţiu — la hidroliza ATP tensiunea intramoleculară scade, produsele reacţiei posedă sarcină negativă, se resping reciproc şi nu pot forma molecula de ATP;

3) gradul de stabilitate, cu rezonanţa mai mare a ADP +P_i decît pentru ATP; primele au forme structurale mult mai stabile. Stabilitatea e determinată de faptul că o parte din electroni sunt dispuşi în configuraţii cu energie mult mai mică decît în configuraţiile caracteristice pentru ATP. Cu alte cuvinte, electronii în ADP şi P_i se situează la niveluri energetice mai joase şi conduc la micşorarea rezervei de energie liberă;

4) prezenţa ionilor de Mg^{++} — afinitatea ADP de Mg^{2+}, este de 6 ori mai mare decît a ATP, reacţia de hidroliză este "împinsă" spre formarea ADP şi P_i.

Energia nu se află în legătură macroergică şi contrar se utilizează pentru scindarea ei. La hidroliza esterilor acidului fosforic energia este condiţionată nu de ruperea legăturii, dar de reducerea energiei din produsele iniţiale. Sistemul de generare a ATP în celulă menţine raportul ATP/ADP x P_i la nivel înalt – circa 500. Hidroliza unei molecule de ATP deplasează raportul concentraţiei produselor la concentraţia substanţelor iniţiale în reacţiile cuplate = 10^8 ori. Succesiunea de reacţii imposibile, din punct de vedere termodinamic, devine posibilă, se realizează prin cuplarea hidrolizei unui număr mare de molecule de ATP.

De exemplu: ΔG^o transformării substanţei A în B este egală cu 4 kcal/mol.

Astfel de transformare devine imposibilă fără surplus de energie. Fiind $Keq = 10^{-\Delta G/1,36}$, obţinem K egală cu $1,15 \times 10^{-3}$, adică, dacă relaţia molară e egală sau mai mare decît $1,15 \times 10^{-3}$, substanţa A nu poate fi spontan transformată în B.

Acest lucru va fi posibil numai dacă reacţia se va cupla cu hidroliza ATP.



$$A + ATP + H_2O \rightleftharpoons B + ADP + P_i + H^+$$

$$\Delta G = -7,3 + 4 = -3,3 \text{ kcal}$$

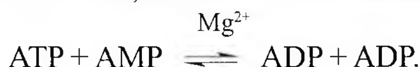
$$Keq = 10^{-3,3/1,36} = 2,67 \times 10^{-2}$$

$$Keq = \frac{[B]}{[A]} \times \frac{[ADP]\,[P_i]}{[ATP]} = 2,67 \times 10^{-2}$$

$$\frac{[B]}{[A]} = Keq \frac{[ATP]}{[ADP][P_i]} = (2{,}67 \times 10^{-2}) \times 500 = 1{,}34 \times 10^5.$$

Aceasta înseamnă că hidroliza ATP asigură posibilitatea transformării A $\longrightarrow$ B atîta timp, cît raportul B/A va atinge valoarea $1{,}34 \times 10^5$. Fără ATP, valoarea e egală cu $1{,}15 \times 10^{-3}$; hidroliza ATP modifică raportul B/A aproximativ de 10^8 ori.

La utilizarea a două grupe fosfat se formează AMP, care se reîntoarce în ciclu sub acțiunea unei enzime prezente în toate țesuturile - *adenilatkinaza*.



$$ATP + AMP \xrightleftharpoons{Mg^{2+}} ADP + ADP.$$

Enzima are și funcția de a menține ATP în celule, cînd reacția catalizată va decurge în direcție inversă.

Metabolismul celular e bazat pe o economie maximă. Viteza metabolismului e determinată de necesitățile în ATP și NADPH. Celula utilizează la moment acea cantitate de substanțe nutritive, care-i permite satisfacerea necesităților energetice, precum și viteza de sinteză a blocurilor de construcție și macromoleculelor celulare. Substanțele din multe organisme și plante nutritive trec în rezervă și servesc drept surse de energie și de carbon (glucidele, lipidele), cu excepția proteinelor și acizilor nucleici.

Procesele catabolice sunt foarte sensibile și reacționează fin la modificările și necesitățile energetice ale celulei. La musca domestică, bunăoară, utilizarea O_2 și a surselor celulare în timpul zborului în decurs de 1 sec. crește de 100 ori.

MECANISMELE DE REGLARE ALE METABOLISMULUI

Mecanismul cardinal este indispensabil de efectul enzimelor alosterice. În calitate de inhibitor serveşte ATP, iar de modulator pozitiv — ADP şi AMP. Pot participa şi alte rezultante finale sau intermediare ale altor căi metabolice.

Multe reacţii sunt reglate de starea energetică a celulei. Indicatorul ei *e sarcina energetică* care se determină: (ATP — conţine două legături anhidrice, ADP — una):

$$Se = \frac{[ATP] + 1/2[ADP]}{[ATP]+[ADP]+[AMP]}$$

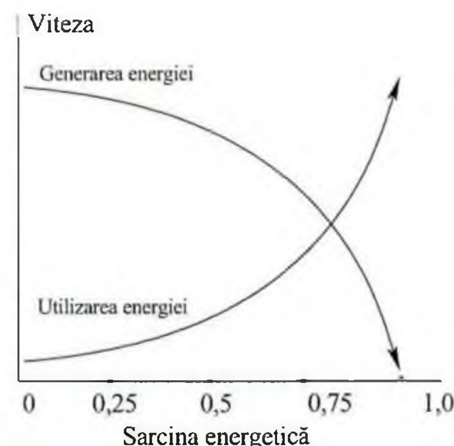


Figura 3.1. ***Reglarea metabolismului***

Valoarea oscilează de la 0 (în sistem numai AMP) la 1 (numai ATP). Daniel Atkinson a demonstrat că toate căile metabolice, responsabile de sinteza ATP, sunt inhibate de sarcina energetică înaltă, pe cînd căile de utilizare ale ATP sunt simultan stimulate (fig.3.1). Reglarea menţine sarcina energetică ca şi pH-ul celulei în oscilaţii limitate (0,80-0,95).

Un indice reglator al metabolismului celular e *potenţialul fosforilării – PF*. El e dependent de fosforul compartimental şi e direct dependent de energia liberă degajată la scindarea ATP:

$$PF = \frac{[ATP]}{[ADP] \times [P_i]} = 500.$$

Mecanismele ce reglează metabolismul sunt dependente de hormonii care accelerează activitatea enzimelor (adaptare imediată) sau de viteza sintezei enzimelor (adaptare de lungă durată), respectiv, adrenalina şi steroizii.

Sunt mecanisme legate de modificările concentraţiei enzimelor în celulă, determinată de relaţiile sinteză-scindare. Inducţia enzimatică condiţionată de concentraţia substanţelor participă activ la reglarea metabolică (vezi cap. I).

Distingem şi *metabolism secundar*, care îşi are funcţia sa aparte la formarea substanţelor specifice necesare celulei în cantităţi mult mai mici — coenzime, hormoni. Sute de biomolecule absolut specifice se produc în aceste căi metabolice, studiate insuficient pînă în prezent.

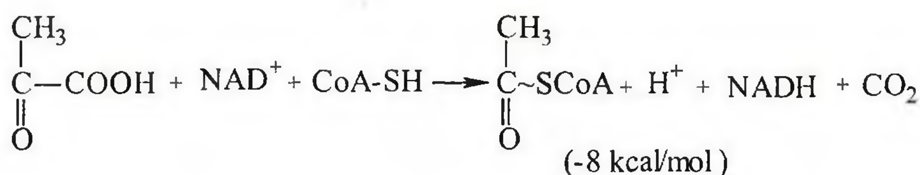
Toate animalele şi celulele plantelor, în condiţii normale, sunt aerobe şi combustibilul lor organic şi-l oxidează complet pînă la CO_2 şi H_2O. *Energia biologic liberă accesibilă* este eliminată din substanţe organice numai în cazul în care toţi atomii de hidrogen, legaţi de atomii de carbon din moleculă, vor fi substituiţi de oxigen, formînd CO_2. Cantitatea de energie liberă, ce se elimină la arderea totală a oricărei substanţe organice, e aproximativ proporţională cu raportul dintre numărul de atomi de hidrogen legaţi de carbon şi numărul total al atomilor de carbon: CH_4 (4); CH_3OH(3); CHOH(1); CH_2O(2); CO_2(0).

DECARBOXILAREA OXIDATIVĂ A PIRUVATULUI

Procesul de respirație studiat în biochimie se referă la mecanismele moleculare de utilizare a O_2 și formarea CO_2 în celule. Unul din produsele principale ale procesului de catabolism este piruvatul (la scindarea glucozei, în primul rînd). După transformarea sa în acetil-CoA, va fi utilizat în ciclul acizilor tricarboxilici (ciclul Krebs sau ciclul acidului citric) — etapă finală de oxidare a moleculelor substanțelor nutritive.

În ce constă procesul de oxidare a piruvatului în acetil-CoA?

Cum se scindează alte molecule pînă la formarea acetil-CoA se va studia în alte teme. Piruvatul se oxidează pînă la acetil-CoA și CO_2, cu participarea mai multor enzime unite structural în *complexul piruvat-dehidrogenazic*. Sistemul multienzimatic în cadrul eucariotelor se află în mitocondrii, al procariotelor — în citozol, catalizînd următoarea reacție sumară:



$$CH_3-CO-COOH + NAD^+ + CoA\text{-}SH \longrightarrow CH_3-CO\sim SCoA + H^+ + NADH + CO_2$$

(-8 kcal/mol)

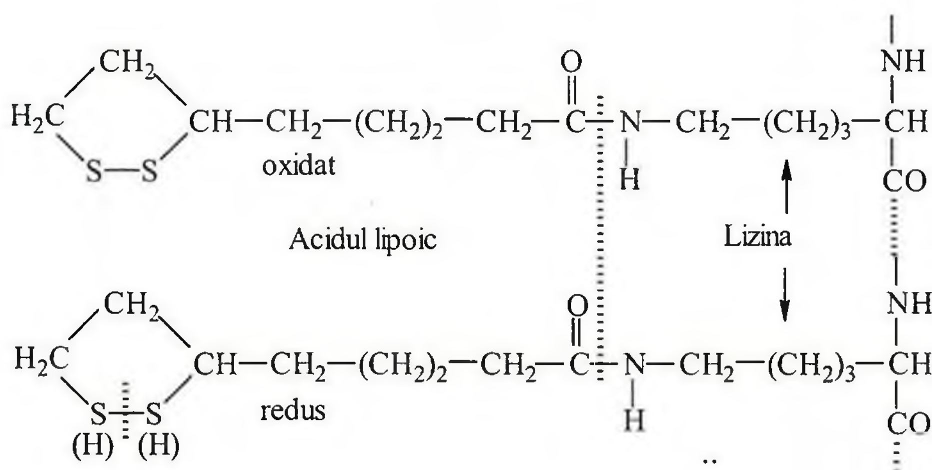
În procesul comun de dehidrogenare și decarboxilare a piruvatului se includ diferite enzime: E_1-piruvat-dehidrogenază, E_2-dihidrolipoil-transacetilaza și E_3-dihidrolipoil-dehidrogenaza, K-E_1 kinaza specifică, F-fosfo-E_1 fosfataza, X-proteina ligand în E_3.

Participă, de altfel, și 5 coenzime — TPP - tiaminpirofosfatul (E_1), FAD, NAD^+, CoA-SH (E_3), acidul lipoic (E_2). Cu alte cuvinte, pentru funcționarea acestui sistem multienzimatic sunt necesare 4 vitamine — B_1, B_2, PP, acidul pantotenic și acidul lipoic.

Lister Rid, savant de la Universitatea din Texas, a cercetat minuțios acest complex la *E.coli*, stabilind că e compus din 48 de lanțuri polipeptidice, neesențial depășind mărimea unui ribozom. Nucleul îl ocupă E_2 (transacetilaza), E_1 si E_3 se leagă în exterior de nucleu. Lanțurile polipeptidice sunt consolidate de forțe necovalente. La pH alcalin sau neutru, în prezența ureei, complexul disociază în componentele sale. Complexul nativ enzimatic se formează prin autoasamblare.

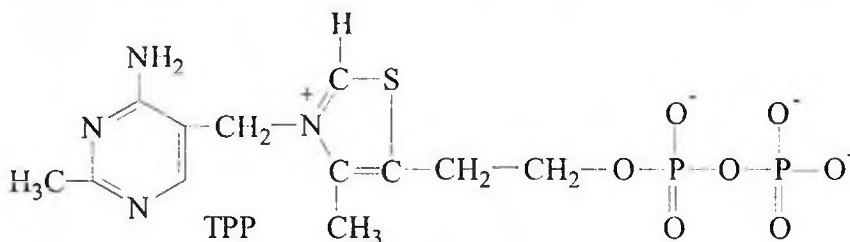
Fiind un complex multienzimatic, actualmente se confirmă că în centru (nucleu) se află componenta E_2 alcătuită din α_1 — monomeri aranjați la suprafața lui; în anumite proporții E_1 ($\alpha_2\beta_2$ - tetramer), E_3 (α_2- homodimer), K ($\alpha_2\beta_2$ - heterodimer) și F —($\alpha\beta$ - heterodimer). Proteina X (α-monomer) are o aranjare nestabilă la moment — posibil ocupă o poziție integrală în autoasamblarea complexului sau se atașează periferic după asamblare. De altfel, recent s-a constatat, că la un complex structural stabil revin 60 componente E_2, 20-30 molecule E_1, 6 molecule E_3, 12 molecule proteina X, 3-15 molecule K și mai mult de 3 molecule de fosfatază (F). Proteina X e un component lipoil auxiliar, ce participă la transferul electronilor.

Complexul determină o cataliză coordonată, în care produsele intermediare sunt fixate rigid de el, iar formarea produselor auxiliare fiind redusă la minim. Ea accelerează viteza reacției, exclude hazardul coleziunii substanțelor cu enzimele respective potențial existente în stare liberă. Produsele intermediare se permută de pe un centrul activ (CA) pe altul - de grupe prostetice E_2 (grupa lipoamidică). Acidul lipoic se atașează de grupa aminică a restului de lizină din E_2. În fiecare lanț polipeptidic, la 2 resturi de acid lipoic se atașează 2 resturi de lizină, ce realizează un braț flexibil de aproximativ 14 Å. Acest braț efectuează o mișcare tur-retur între grupele prostetice ale sistemului multienzimatic.

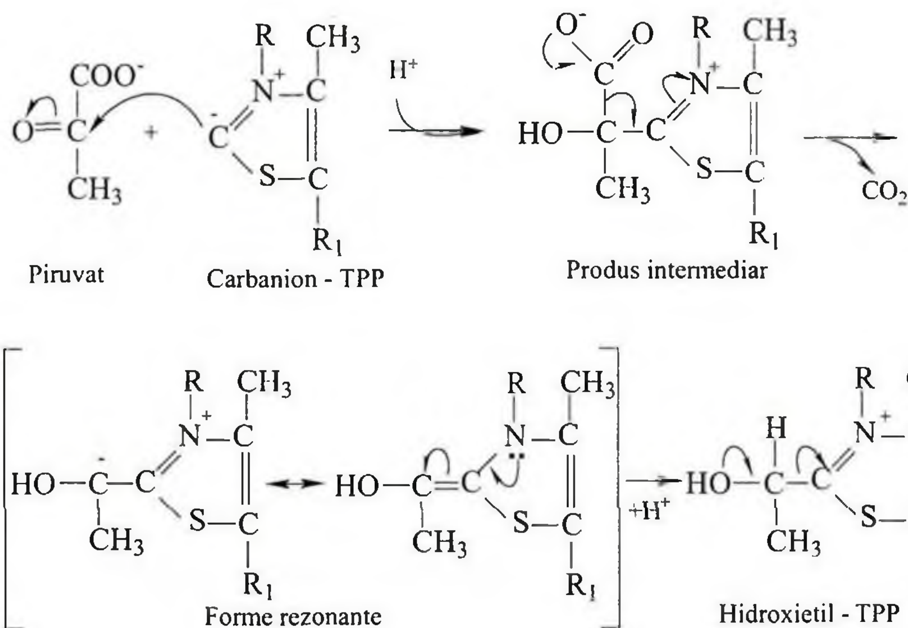


Componenții lipoamidici interacționează. Sarcina lor în procesul de modificări în ciclu se schimbă de la 0-1 pînă la 2, la o ionizare completă a grupelor sulfhidrilice. Anume modificările de sarcină reprezintă forța motrice a mișcării coordonate a grupei lipoice.

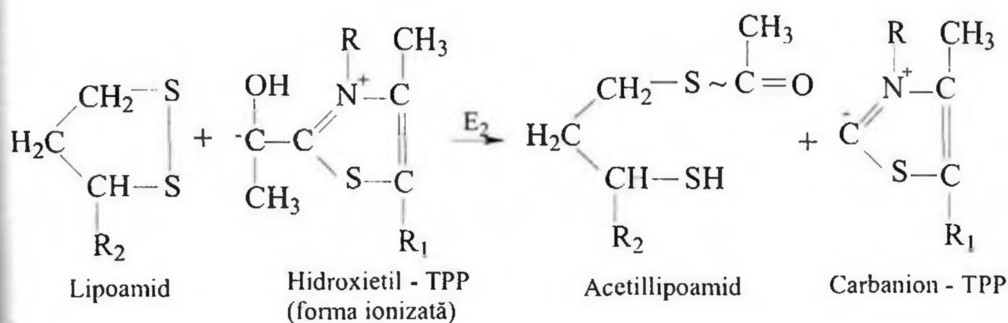
Procesul decurge pe etape. În etapa I piruvatul adiționează la TPP, după care are loc decarboxilarea lui. Este catalizată reacția de E_1, rolul hotărîtor revenind particularităților TPP — exponentul acid al atomului C aranjat, ionizează între atomii N și S ai inelului tiazolic, el formînd un carbanion, ușor adiționînd la grupa carbonil a piruvatului.



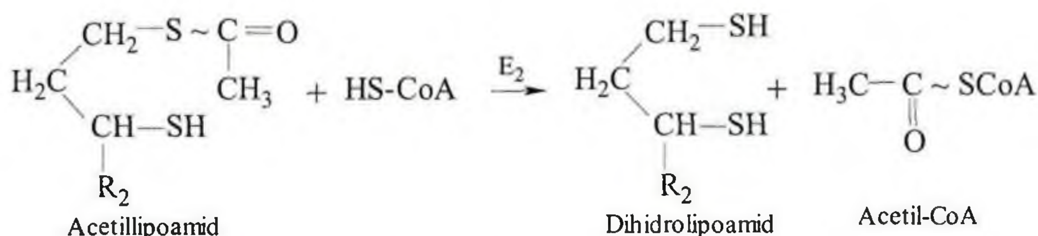
Azotul cu sarcina pozitivă (+) adiționează electroni, stabilizînd constituirea sarcinii negative necesară decarboxilării. Protonarea formează hidroxietiltiamino pirofosfatul.



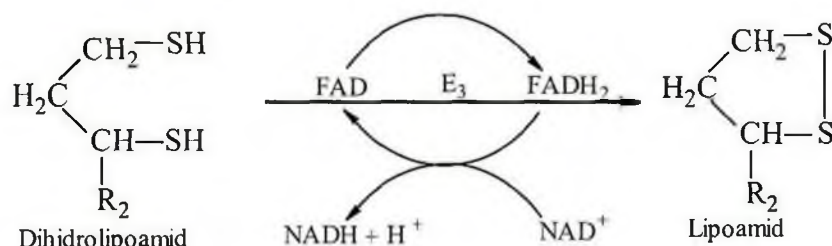
În etapa următoare grupa hidroxietilică legată de TPP se oxidează o dată cu formarea acetil radical şi simultan se permută pe lipoamid. Ca oxidant serveşte grupa disulfidică, care se transformă în sulfhidrilică. Reacţia e catalizată de E_2 (dihidrolipoil transacetilază) cu formarea acetillipoamidei.



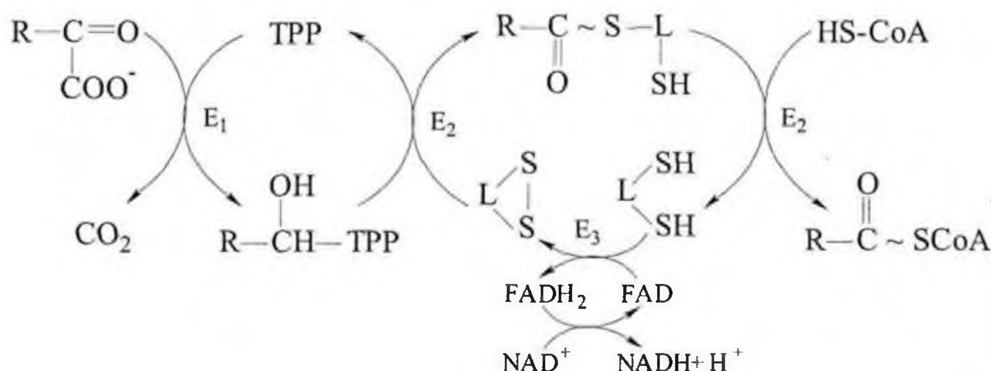
La etapa a III-a grupa acetil se translochează pe CoA, formînd acetil-CoA. Procesul e catalizat similar de E_2, translocarea fiind însoţită de menţinerea legăturii macroergice tioesterice.



În etapa a IV-a are loc regenerarea formei oxidate a lipoamidei. Reacția e catalizată de E_3. Oxidantul e NAD^+, și rolul prostetic îi revine FAD.



Procesul e ireversibil, avînd $\Delta G° = -8$ kcal/mol. Etapa descrisă este cheia ireversibilă a metabolismului. Animalele nu sunt capabile să transforme acetil-CoA în glucoză. Acetil-CoA se încadrează în ciclul Krebs sau în sinteza lipidelor. Reacțiile pot fi reproduse schematic în felul următor:



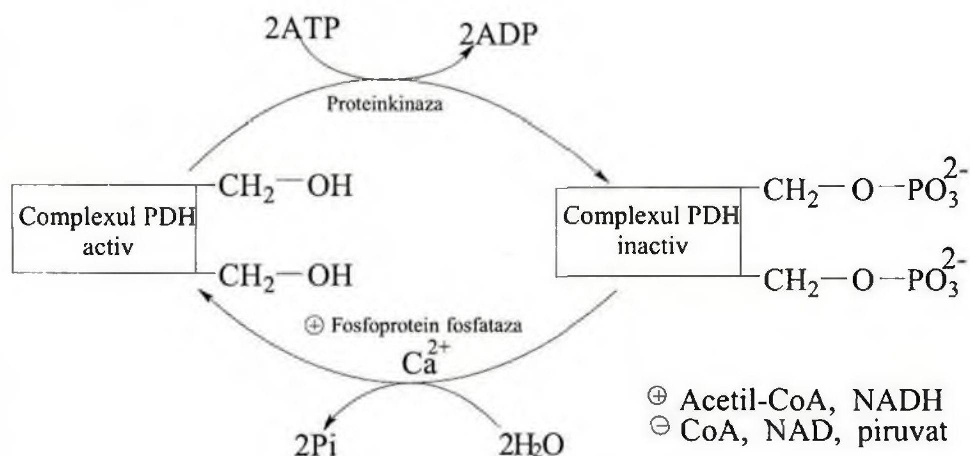
Complexul fermentativ descris mai sus se reglează prin:

1. Inhibarea prin rezultantele reacției (retroinhibiție) de acetil-CoA, NADH—primul compus inhibînd E_2, NADH-E_3. Efectul este reversibil la acțiunea NAD^+ și HSCoA. Inhibiția alosterică este amplificată de acizii grași macromoleculari.

2. Reglarea nucleotidică, prin sarcina energetică. Este inhibat complexul de GTP și activat de AMP. Activitatea complexului se reduce atunci cînd celula conține energie accesibilă și se amplifică, în caz contrar.

3. Complexul piruvat dehidrogenazic (CPDH) își pierde din activism la fosforilarea serinei de ATP (modulator pozitiv pentru *kinaza piruvat dehidrogenazei)* o dată cu

formarea fosfopiruvat dehidrogenazei (*reglarea covalentă*). Dacă ATP se micşorează, are loc scindarea hidrolitică a fosfatului de CPDH. Reacţia este catalizată de *fosfataza piruvat dehidrogenazei*. Atît kinaza, cît şi fosfataza persistă în complexul piruvat dehidrogenazic.

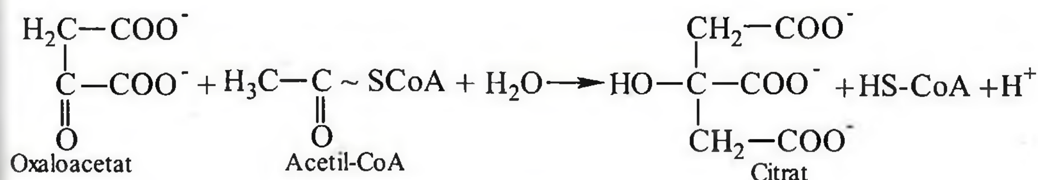


Reglarea covalentă a complexului piruvat dehidrogenazic

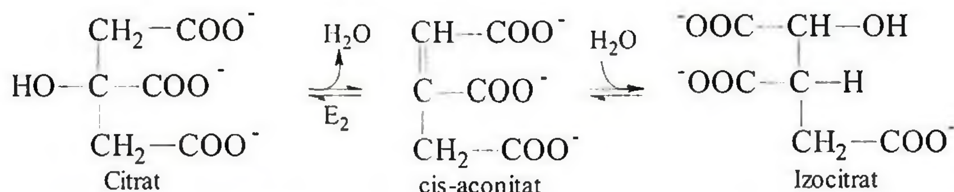
Fosforilarea se amplifică la raportul înalt de ATP/ADP; acetil-SCoA/HSCoA; $NADH/NAD^+$, iar defosforilarea—la concentraţii înalte de piruvat şi ioni de Ca^{2+}.

CICLUL KREBS

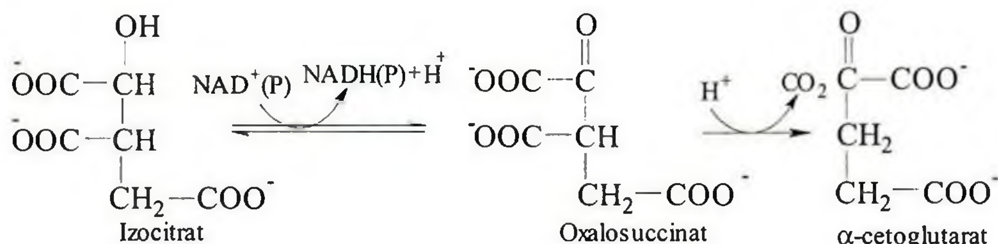
Reprezintă un ciclu primordial pentru funcţionarea sistemelor vii. Sistemul enzimatic acţionează cu o fineţe deosebită. Ciclul începe cu retrocedarea de către acetil-CoA — oxaloacetatului grupei acetil, cu formarea compusului de 6 atomi de carbon - citrat. Prima reacţie este catalizată de *citrat sintază* — ferment reglator. Produsul intermediar îl constituie citril-CoA. Reacţia sumară deviază spre dreapta (ΔG^o = -7,7 kcal/mol), rezultantă a hidrolizei.



Enzima, *aconitaza*, catalizează transformarea reversibilă a citratului în izocitrat prin formarea produsului intermediar cis-aconitat, ce nu deviază de la centrul activ al enzimei. Izomerizarea se realizează prin dehidratare, succedată de hidratare. Conţinutul izocitratului e mai mic de 10%, reacţia evoluează de la stînga spre dreapta, şi produsul ei se încadrează rapid, succesiv, în celelalte stadii ale ciclului. Aconitaza reprezintă o enzimă compusă, ce conţine fier şi sulf acidolabil, formînd centre fiero-sulf.

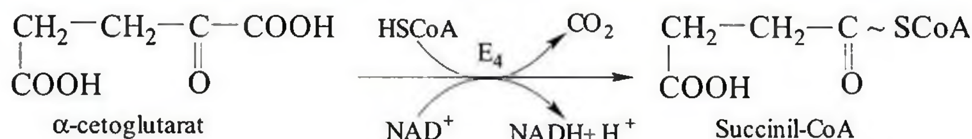


Decarboxilarea oxidativă a izocitratului, catalizată de *izocitrat dehidrogenază*- (ICDH), este prima reacție de oxido-reducere din ciclu, cu formarea ulterioară a α-cetoglutaratului.

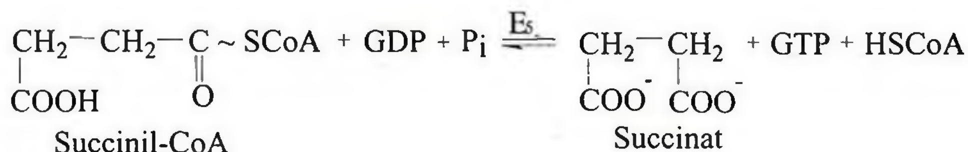


ICDH este o enzimă de două tipuri — NAD^+ și $NADP^+$ dependentă: NAD^+d — localizată în mitocondrii; $NADP^+$d — localizată atît în mitocondrii, cît și în citozol. Modulator pozitiv al reacției este ADP, enzima practic nu funcționează fără ADP; reacția necesită ioni de Mg^{2+} sau Mn^{2+}.

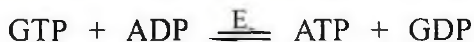
A doua reacție de oxido-reducere (a patra în ciclu) este decarboxilarea oxidativă a α-cetoglutaratului, catalizată de *complexul α-cetoglutarat dehidrogenazic* cu formarea succinil-CoA și a CO_2, $NADH+H^+$. Mecanismul acestei reacții e asemănător cu transformarea piruvatului în acetil-CoA. Sunt utilizați aceiași cofactori ai trei enzime: *α-cetoglutarat dehidrogenaza,* (A'), *transsuccinilaza* (B') și (C') *dihidrolipoil dehidrogenaza.* Miezul complexului e subunitatea B', iar subunitatea C' este identică pentru ambele complexe. Aceste două complexe reprezintă asociații omoloage de enzime.



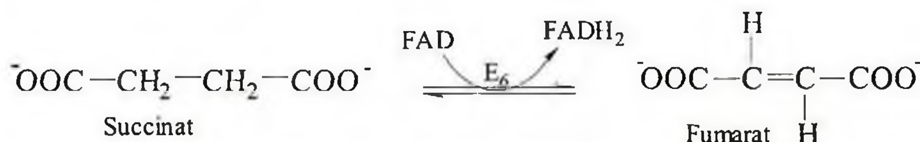
Hidroliza succinil-CoA dă aproximativ 8 kcal/mol. Scindarea e cuplată cu fosforilarea GDP, catalizată de *succinil-CoA sintetaza* și formarea GTP.



Enzima *nucleozidfosfo kinaza* transferă grupa fosfat de la GTP la ADP cu formarea ATP. Ea este unica reacție a ciclului, fiind însoțită de formarea directă a compușilor macroergici fosfați. E o *fosforilare la nivel de substrat* — drept izvor de energie servește oxidarea unei substanțe organice.



Succinatul este dehidrogenat, cu formarea fumaratului — reacție catalizată de *succinat dehidrogenaza* (SDH), avînd ca acceptor H_2-FAD. În molecula de SDH inelul izoaloxazinic a FAD-ului e legat covalent de partea proteică cu restul histidinei din centrul activ (CA) al enzimei. Molecula conține 4 atomi de fier şi 4 atomi de sulf, formînd proteine fiero-sulf.

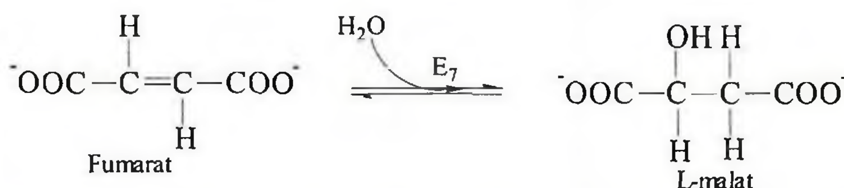


SDH conține două componente:

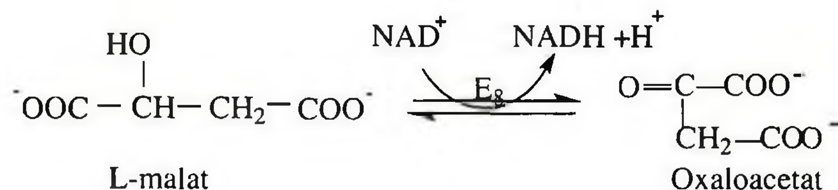
1. 70 FAD kDa şi două clastere de FSP (proteine fiero-sulf);
2. 27 kDa — claster proteic.

Enzima SDH este o proteină integrală a membranei interne din mitocondrii, iar inhibitor concurent al SDH este malonatul. $FADH_2$ format nu se desprinde de enzimă, electronii sunt direct transferați pe Fe^{3+} al enzimei. Acceptor final poate servi O_2 molecular.

Următoarea reacție constă în hidratarea fumaratului cu formarea L-malatului catalizată de enzima stereospecifică *fumaraza* (are loc o transadiționare de H şi OH). Enzima e compusă din 4 subunități identice (4LPP).



L-malat dehidrogenaza, componenta matricei mitocondriale, catalizează dehidrogenarea L-malatului (NAD^+), cu formarea oxaloacetatului (OA). Echilibrul e deplasat (la pH = 7,0, concentrație - 1,0 M) spre stînga, însă în celulele intacte — spre dreapta, oxaloacetatul se asimilează rapid şi concentrația reală e foarte mică în celule (10^{-6} mol).



În urma acestui ciclu de reacții are loc: 1) regenerarea oxaloacetatului, care interacționează cu o nouă moleculă de acetil-CoA; 2) gruparea acetilică se asimilează în două molecule de CO_2; 3) sunt captați ionii de hidrogen, bogați în energie.

Stoichiometria ciclului:



Acetil-CoA + 3NAD$^+$ + FAD + GDP + P_i + $2H_2O$ → $2CO_2$ + 3NADH + $FADH_2$ + GTP + $2H^+$ + HSCoA.

Reacția descrisă confirmă că O_2 molecular la ciclul Krebs (CK) nu participă nemijlocit, ciclul funcționînd numai în condiții aerobe, deoarece NAD$^+$ și FAD în mitocondrii pot fi regenerate numai după transferul electronilor pe O_2 molecular. Ciclul manifestă caracter aerob, spre deosebire de glicoliză, ce decurge atît în condiții aerobe, cît și anaerobe. Cauza constă în faptul că la transformarea piruvatului în lactat în cadrul glicolizei are loc regenerarea de NAD$^+$.

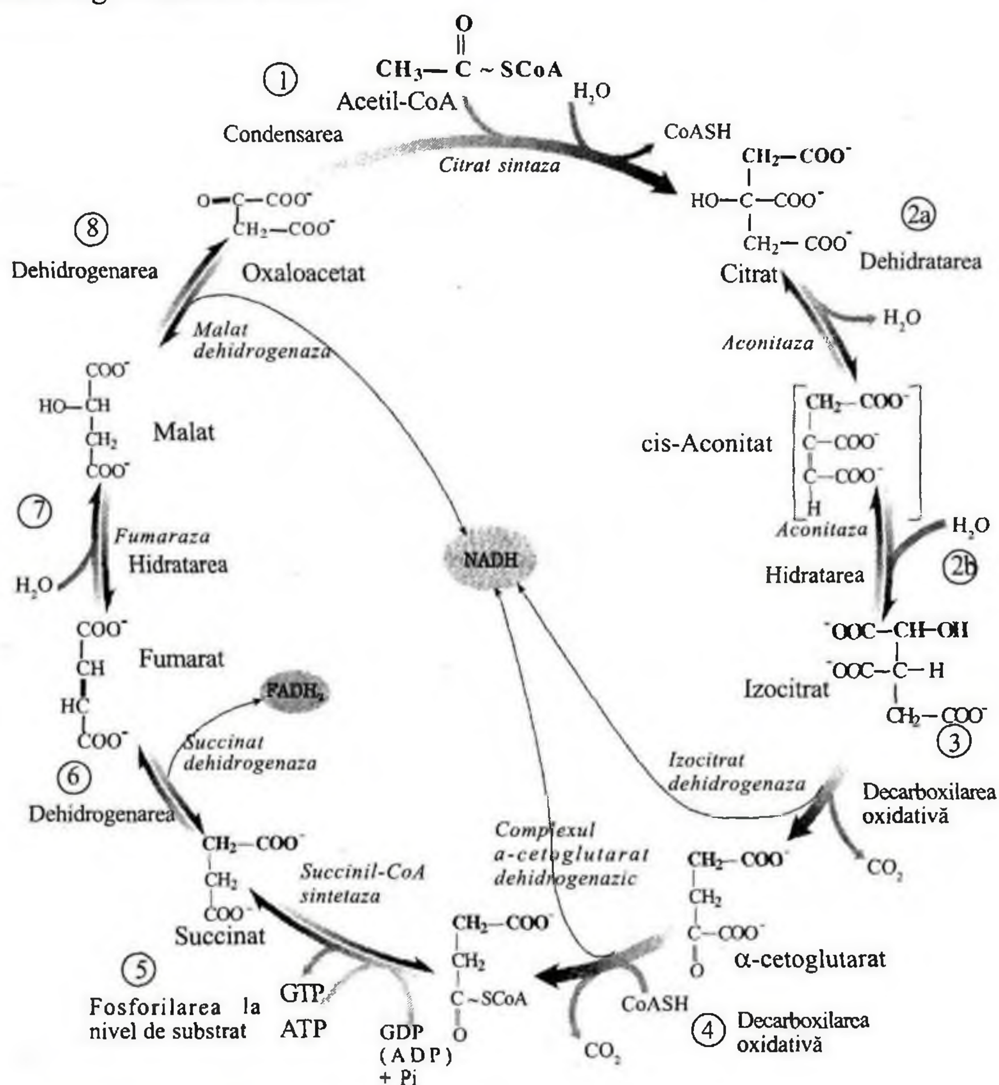


Figura 3.2. ***Ciclul acizilor tricarboxilici (Ciclul Krebs)***

Care-i esența biologică a prezenței ciclului acizilor tricarboxilici? Care-i cauza că oxidarea grupei acetilice solicită un ciclu atît de complex?

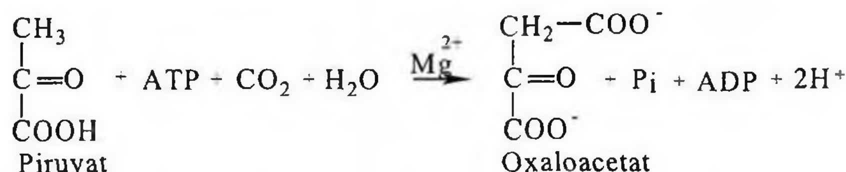
Molecula acidului acetic, cu dimensiuni mici şi o structură relativ simplă, are o particularitate deosebită: grupa sa metilică e foarte rezistentă la oxidarea chimică. Pentru o oxidare directă pînă la CO_2 sunt necesare condiții rigide, incomparabile cu cele din celulă. În timpul evoluției celulele se conformă căilor din cele mai adaptabile, ce nu comportă energie mare de activare. Celulele ataşează acetatul la OA, cu formarea citratului care se dehidrogenează şi se decarboxilează cu mult mai uşor decît acetatul. La aparență, unele reacții sunt foarte complicate, dar studierea principiilor ce stau la baza acestor mecanisme ale reacțiilor organice atestă descoperirea celei mai rezonabile căi chimice ce asigură atare transformare.

Ciclul acizilor tricarbonici (CAT) e calea principală de scindare comună a glucidelor, proteinelor, lipidelor ce asigură generarea ATP.

Reacții anaplerotice

Ciclul Krebs îndeplineşte şi alt rol — furnizează produse intermediare pentru procesele de biosinteză. Utilizarea lor pentru biosinteză trebuie să fie însoțită obligatoriu de compensarea lor, în caz contrar funcția ciclului se va sista. Reacțiile fermentative, ce asigură completarea produselor intermediare ale ciclului, se numesc *reacții anaplerotice* sau reacții de completare.

Reacția de carboxilare a piruvatului cu CO_2 şi formarea oxaloacetatului are o însemnătate primordială. Ea este catalizată de *piruvat carboxilază* şi decurge intensiv în ficat, rinichi. Ca modulator pozitiv serveşte CH_3—CO~SCoA



Enzima catalizatoare de reacție este complexă, conține 4 grupe prostetice (4 biotine). Vitamina H este covalent legată de aminogrupa restului de lizină din centrul activ al enzimei. Reacția decurge în două etape:

1. Oxidul de carbon în primul rînd se fixează de atomul azot din biotină, se activează cu utilizarea ATP (covalent).



ATP + CO_2 + E-biotin + HOH ⟶ E-biotin-CO_2 + ADP + P_i + $2H^+$

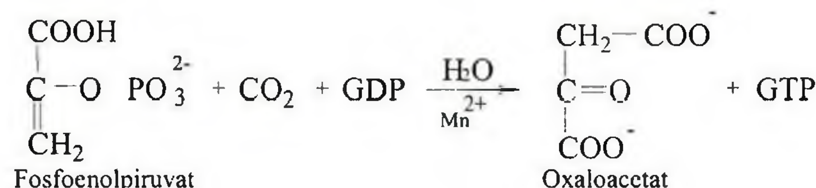
2. Apoi are loc transferul de piruvat pe enzimă cu formarea oxaloacetatului.



E-biotin-CO_2 + Piruvat ⟶ E-biotin + Oxaloacetat

Piruvat carboxilaza reprezintă o enzimă reglatoare. CH_3—COSCoA asigură, cînd e în surplus, cu combustibil ciclul Krebs (CK), stimulînd şi reacția piruvat carboxilică. În final, se formează surplus de oxaloacetat, deci rezultă că şi ciclul în ansamblu va utiliza mai mult acetil-CoA în reacția de sinteză a citratului. Diminuarea de viteză la formarea oxaloacetatului e cauzată de mica convertire a acetil-CoA în ciclurile respective.

În miocard şi muşchii scheletali reacţia anaplerotică principală e catalizată de *fosfoenolpiruvatcarboxi kinază*. Are loc scindarea fosfoenol piruvatului — produs macroergic format în procesul de glicoliză. Energia eliberată se utilizează pentru carboxilare cu formarea oxaloacetatului, restul de energie se depozitează în GTP.



Produsele unui tur al ciclului citric sunt reprezentate în fig.3.3.

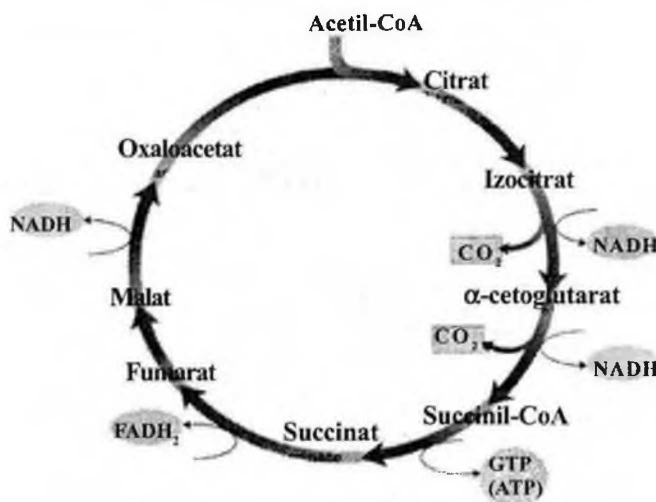


Figura 3.3. ***Produsele unui tur al ciclului citric***

Reglarea ciclului Krebs

Procesul e coordonat perfect cu necesităţile de ATP în celulă. Următoarele reacţii sunt reglate:

1. Sinteza citratului:

a) e dependentă de concentraţia de substraturi — oxaloacetat şi acetil-CoA, ce servesc ca modulatori pozitivi;

b) e dependentă de activitatea citrat sintazei, ce e inhibată de succinil-CoA; acizii graşi; NADH; citrat — ultimele 2 substanţe au efect numai în unele celule.

2. Reacţia catalizată de izocitrat dehidrogenază:

a) este activată de ADP — se confirmă efectul cooperativ între legarea izocitratului cu Mg^{2+} şi ADP;

b) este inhibată de NADH şi NADPH.

3. Reacția catalizată de complexul α-cetoglutarat dehidrogenazic. Complexul enzimatic este inhibat de succinil-CoA și NADH, produsele reacției. De altfel, este inhibat și de sarcina energetică mare.

Patologiile medicale

Deficitul enzimelor implicate în ciclul Krebs (fumaraza, α-cetoglutarat dehidrogenaza) este frecvent pe parcursul unor afecțiuni ereditare, caracterizate prin:

a) acidoză lactică, produsă în urma acumulării piruvatului rezultat din glicoliză, care nu poate fi metabolizat prin conversia în acetil-CoA și este transformat în acid lactic;

b) deficit energetic marcat, cu repercusiuni asupra dezvoltării neuromotorii, manifestat prin retard mental, hipotonie și apariția encefalopatiilor severe;

c) amplificarea excesivă a cetogenezei, pe baza moleculelor de acetil-CoA, care nu pot fi degradate prin ciclul Krebs.

Formele cele mai severe se manifestă încă în perioada perinatală, prin leziuni neurologice și musculare. Aceste afecțiuni sunt rare, deoarece funcționarea normală a enzimelor din ciclul Krebs este esențială pentru dezvoltarea organismului și desfășurarea normală a activităților celulare. Deficitul energetic marcat conduce la degenerarea și moartea rapidă a celulelor afectate.

Deficitul *piruvat carboxilazei* sau al uneia din subunitățile piruvat dehidrogenazei se manifestă prin reducerea semnificativă a funcționării ciclului Krebs, ca urmare a imposibilității formării substanțelor sale principale. Consecințele pe plan clinic sunt datorate deficitului energetic și acumulării de acid lactic, piruvat, α-cetoglutarat (în cazul deficitului dihidrolipoil dehidrogenazei din structura CPDH, subunitate comună tuturor α-cetoacid dehidrogenazelor). Alanina și acizii ramificați prezintă niveluri plasmatice înalte, ca urmare a blocării catabolismului lor în condițiile reducerii fluxului intermediatorilor în ciclul Krebs.

Situațiile caracterizate prin scăderea marcată a oxigenării tisulare (hipoxie sau anoxie) intervin în cazul insuficienței cardiorespiratorii acute, al stărilor de șoc ș.a. Aportul insufucient de oxigen cauzează încetinirea fluxului metabolic la nivelul lanțului respirator mitocondrial și, implicit, inactivarea ciclului Krebs. Rezultă un deficit energetic important, deoarece ATP nu poate fi regenerat decît în baza glicolizei anaerobe, a cărei randament energetic este scăzut (2ATP). Acumularea piruvatului rezultat din glicoliză conduce la apariția acidozei lactice.

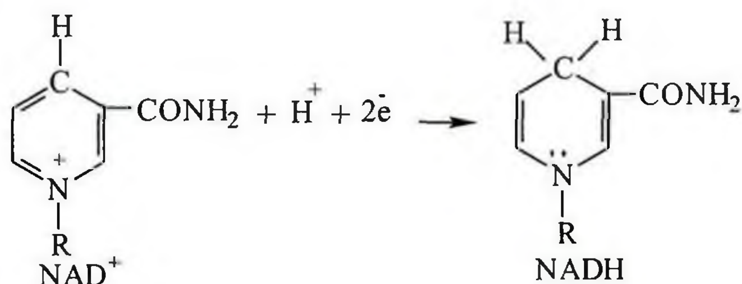


Hans Krebs 1900 -1981

OXIDAREA BIOLOGICĂ - RESPIRAȚIA TISULARĂ

Oxidarea biologică reprezintă totalitatea proceselor de oxido-reducere ce decurg în celule şi ţesuturi. Cum se oxidează moleculele cu rol de combustibil? Oxidarea are loc prin dehidrogenare, adică prin donarea atomilor de hidrogen. Ei sunt transferaţi în formă de protoni (H^+) şi electroni (e^-), cu ajutorul coenzimelor specifice, dar nu direct la O_2. Forma redusă transmite pe lanţul respirator în membrana internă a mitocondriilor electroni cu un mare potenţial energetic. Acest transfer este însoţit de formarea ATP din ADP şi P_i. Procesul e numit *fosforilare oxidativă* — sursa de bază a ATP la organismele aerobe. De altfel, electronii cu înalt potenţial energetic pot fi utilizaţi şi în procesul de biosinteză, ce necesită ATP şi echivalente reduse.

Acceptorul principal de electroni este NAD^+. Inelul nicotinamidic activ adiţionează ionul de hidrogen şi doi electroni, constituind echivalentul hidridionului.



NAD^+ serveşte ca acceptor în reacţii de tipul:

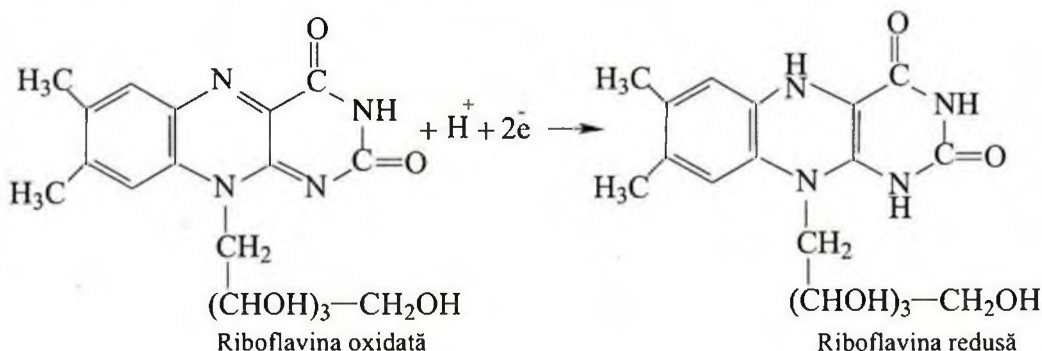


Al doilea H^+ rămîne în soluţie.

Alt acceptor principal este FAD şi participă în reacţii de tipul:



Porţiunea activă e inelul izoaloxazinic, unde se adiţionează protonii şi electronii.



Riboflavina oxidată

Riboflavina redusă

Compuşii ce joacă rol de precursori în biosinteză sunt oxidaţi mai puternic decît produsele reacţiei. De aceea, pentru realizarea procesului sunt necesare, în afară de ATP, şi echivalente reducătoare. Rolul de donator îl are forma redusă a $NADP^+ \longrightarrow NADPH$. Diferă de NAD^+ prin prezenţa fosfatului conjugat cu legătura esterică prin 2'-OH a adenozinei, utilizîndu-se numai în procesele de biosinteză, pe cînd NADH — preponderent la generarea ATP.

Culminarea respiraţiei tisulare o reprezintă transportul de electroni şi fosforilarea oxidativă. Omul cu o greutate medie de 70 kg utilizează pe zi circa 2800 kcal. Pentru a recepţiona această energie din ATP în condiţii standard e nevoie de 2800 : 7,3 = 384 mol ATP sau 190 kg de ATP. Organismul uman conţine 50g de ATP. Pentru satisfacerea necesităţilor de ATP, ea trebuie să fie scindată şi sintetizată de mii de ori. În limite foarte mari se modifică viteza sintezei ATP în organism: minimum — somnul şi maximum — la eforturi intensive, ceea ce denotă că fosforilarea oxidativă (FO) este nu numai un proces primordial şi incontinuu, dar şi un autoreglator foarte fin.

Lanţul respirator

Este un ansamblu de proteine aranjate într-o anumită succesiune cu grupe prostetice fixate rigid, care posedă capacitatea de a adiţiona şi a dona electroni şi protoni saturaţi de energie. Electronii, transferîndu-se de la o proteină la alta, îşi pierd energia liberă. O parte considerabilă a ei se acumulează în ATP, prin intermediul mecanismelor moleculare.

Fiecărei perechi de electroni, transferaţi de la NADH la O_2 pe lanţul respirator, i se sintetizează 3 molecule de ATP. Locusurile, unde energia se elimină în cadrul proceselor de oxido-reducere, cu formarea de ATP, se numesc ***puncte de fosforilare***. La o rotaţie a ciclului Krebs dehidrogenazele specifice scindează de la substraturi 4 perechi de atomi de H, care într-un locus anumit îşi donează electronii lanţului respirator şi se transformă în H^+, cu deplasarea în mediul apos. Electronii parcurg pe lanţul respirator pînă la O_2 — acceptorul final al electronilor la organismele aerobe.

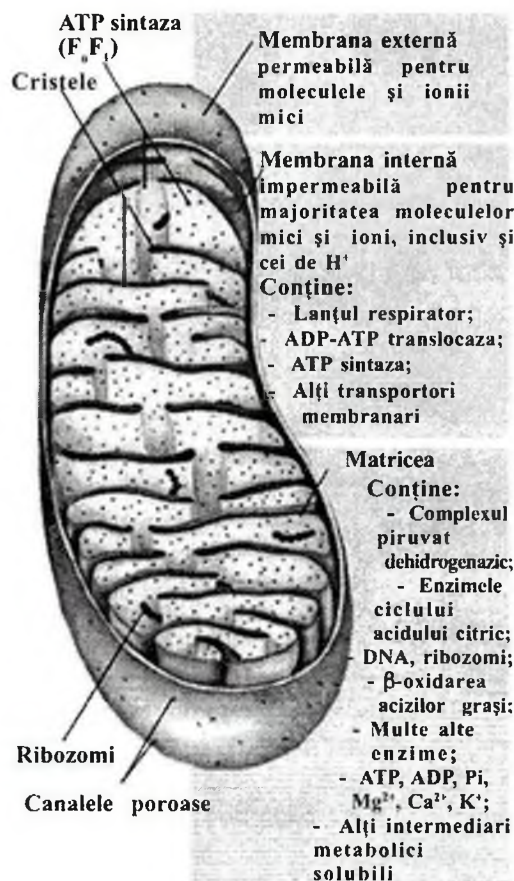


Figura 3.4. *Structura mitocondriei*

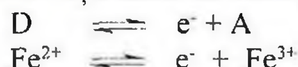
Fosforilarea oxidativă e localizată în mitocondrii (fig.3.4). Aceste organite ovale conţin enzime ale ciclului Krebs şi enzime

ale oxidării acizilor graşi. Mitocondriile posedă două sisteme de membrane: externă şi internă, ultima are o suprafaţă foarte mare şi formează cristele. O parte indispensabilă a membranei interne reprezintă ansambluri respiratorii şi enzime ce catalizează sinteza ATP.

Membrana internă are o structură complexă şi-i impermeabilă pentru majoritatea ionilor. Membrana externă, dimpotrivă, are o permeabilitate majoră pentru ionii şi moleculele mici. Ea conţine *monoaminoxidaza.* În spaţiul intermembranar se află enzima adenilatkinaza, în matrice (compartiment determinat de membrana internă) sunt localizate dehidrogenazele specifice ciclului Krebs, precum şi enzimele oxidării acizilor graşi.

În ce constă esenţa reacţiilor de transfer al electronilor?

Acestea sunt reacţii de oxido-reducere. În calitate de donatori servesc reducătorii, drept acceptor — oxidanţii. În comun funcţionează ca redox-pereche.



$$D \rightleftharpoons e^- + A$$

$$Fe^{2+} \rightleftharpoons e^- + Fe^{3+}$$

Fe^{2+} şi Fe^{3+} ⟶ sunt redox-pereche.

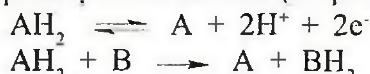
Distingem 4 modele de transfer al e^- de la o moleculă la alta:

1) Transfer direct al electronilor:



$$Fe^{2+} + Cu^{2+} \rightleftharpoons Fe^{3+} + Cu^{+}$$

2) Transferul în componenţa atomului de H (H^+ şi e^-):

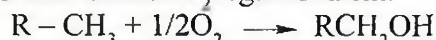


$$AH_2 \rightleftharpoons A + 2H^+ + 2e^-$$

$$AH_2 + B \longrightarrow A + BH_2$$

3) În formă de hidrid ion (:H^+) în cazul transferului de NAD dehidrogenaze.

4) Transferul la interacţiunea directă a reducătorului organic cu O_2, ce conduce la formarea unui produs care include O_2 legat covalent:



$$R - CH_3 + 1/2O_2 \longrightarrow RCH_2OH$$

Toate modelele de transfer al electronilor sunt proprii celulelor vii. Capacitatea de a dona reversibil electroni se exprimă cantitativ prin *potenţialul redox-standard.* E_0 - mărime egală cu forţa electromotoare exprimată în volţi, ce apare în semiconductor, în care donatorul de electroni şi acceptorul cuplat cu el acţionează în concentraţii de 1,0 mol la T = 25° C şi pH = 7,0, formînd un echilibru cu electrodul ce adiţionează e^- de la donator şi-i transferă la acceptor. În calitate de semielement standard se ia electrodul de hidrogen. Forţa electromotoare la concentraţia ionilor de H^+ 1,0 mol (pH = 0) şi T = 25°C e egală cu zero. Pentru pH = 7,0 potenţialul standard e egal cu 0,41V. E acceptată formula *potenţial de reducere.* Dacă potenţialul sistemului e negativ, rezultă o capacitate mai mare de a elibera electroni. Cu cît valoarea lui e mai pozitivă, cu atît e mai mare capacitatea de a adiţiona electroni. Ştiind mărimea E_0 a diferitor redox-perechi, se poate pronostica direcţia torentului de electroni de la o pereche la alta.

Torentul de electroni e orientat în direcţia micşorării energiei libere a sistemului. (fig.3.5.) Cu cît mai mare e diferenţa potenţialului dintre două redox-perechi, cu atît mai mare e diminuarea energiei libere la transferul electronilor. Trecînd prin lanţul respirator de la NADH (-0,32V) la O_2 (0,82V), electronii pierd o cantitate suficientă de *energie liberă.* ΔG^0 poate fi calculată după formula:

$\Delta G = -n \times F\Delta E_0$, unde **n** este numărul de electroni;

F - indicele Faraday egal cu 23062 cal · V^{-1} · mol^{-1};

ΔE_0 - diferența de potențial.

$\Delta G^o = -2 \times 23062\ [0,82-(-0,32)] = -52,6$ kcal · mol^{-1} = -220 kJ · mol^{-1}. Energia respectivă este efectiv suficientă pentru sinteza a 3 mol de ATP (3 x (-7,3) = -21,9 kcal).

În lanțul respirator se pot identifica ușor trei segmente, în care transferul electronilor e însoțit de scăderea bruscă a energiei libere: locusuri de sintetizare ATP. Forța motrice a fosforilării oxidative reprezintă potențialul de transfer al electronilor inerenți NADH sau $FADH_2$.

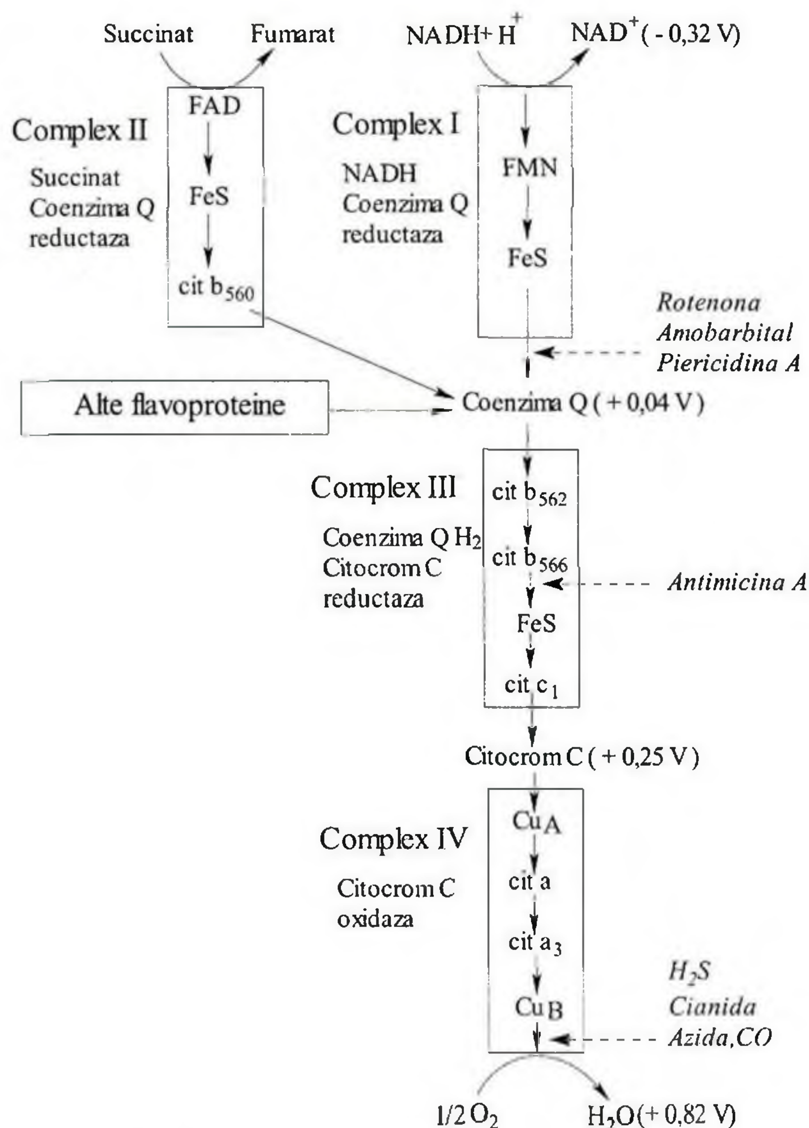


Figura 3.5. *Lanțul respirator mitocondrial*

Caracteristica complexelor lanțului respirator

Complexul I. NADH-Q-oxidoreductaza.

Torentul de electroni din lanțul respirator în mare măsură este determinat de activitatea dehidrogenazelor NAD^+ sau $NADP^+$ dependente şi doar foarte puține dintre ele semnificativ (GDH) pot să interacționeze cu ambele coenzime.(fig.3.6).

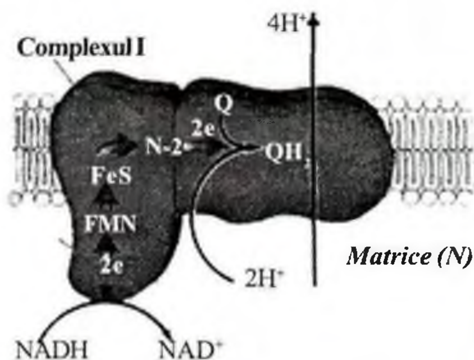


Figura 3.6. ***NADH: ubichinon oxidoreductaza (Complexul I)***

Unele dehidrogenaze sunt localizate în mitocondrii, altele în citozol, dar semnificativ e că dehidrogenazele din citozol cît şi cele din mitocondrii interacționează cu NAD^+, respectiv. Membrana mitocondrială e impermeabilă pentru aceste coenzime. Coenzima NAD^+ are funcția de colector, adunînd H_2 de la diferite substraturi (NADPH, izocitrat, α-ceto-glutarat, piruvat, lactat, malat, β-oxibutirat, β-hidroxiacil-CoA) (fig.3.7.).

Ulterior perechea de echivalenți reduşi e transferată pe flavinproteide (FMN dependente), iar electronii sunt preluați de complexele fiero-sulf cu rol de grupe prostetice. Flavinmononucleotidul formează cu aceşti compuşi un complex enzimatic NADH-Q-reductază. Fierul nu e de natură hemică şi rezultă că proteinele poartă denumirea fiero-proteine nehemice sau centre fiero-sulf. Se atestă trei tipuri de centre FeS:

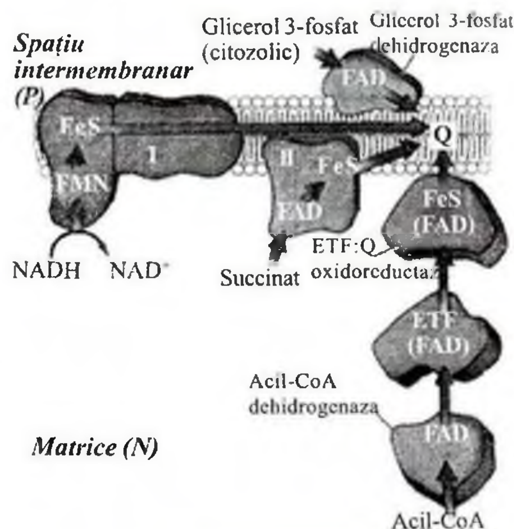


Figura 3.7. ***Transferul electronilor de la NADH, succinat, acil-CoA şi glicerol-3-fosfat pe ubichinonă***

1. Atomul de Fe e tetraedric coordonat cu SH grupe a patru resturi de cisteină proteică, FeS_4 (fig.3.8. (a)).

2. Fe_2-S_2 conține 2 atomi de Fe şi doi disulfizi neorganici adiționați la 4 resturi de cisteină (fig.3.8. (b)).

3. Fe_4-S_4 - 4 atomi de Fe şi 4 disulfizi neorganici adiționați la 4 resturi de cisteină (fig.3.8. (c)).

S-a confirmat că NADH-Q-reductaza conține două centre: Fe_2-S_2 şi Fe_4-S_4.

De la Fe-S al enzimei electronii şi H^+ sunt transferați la coenzima Q.

Reducerea de potențial constituie 0,42V, ΔG = -19,4 kcal/mol şi e suficient pentru sinteza a 2 mol de ATP, dar se sintetizează un singur mol de ATP, restul energiei risipindu-se sub formă de căldură. Enzima NADH-Q-reductaza e compusă din 16 subunități polipeptidice.

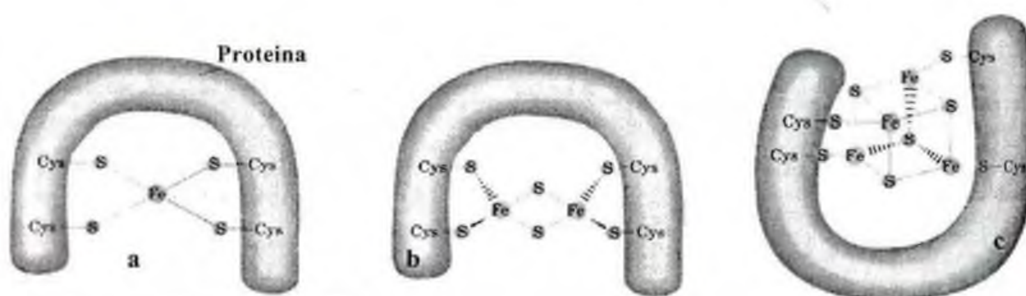
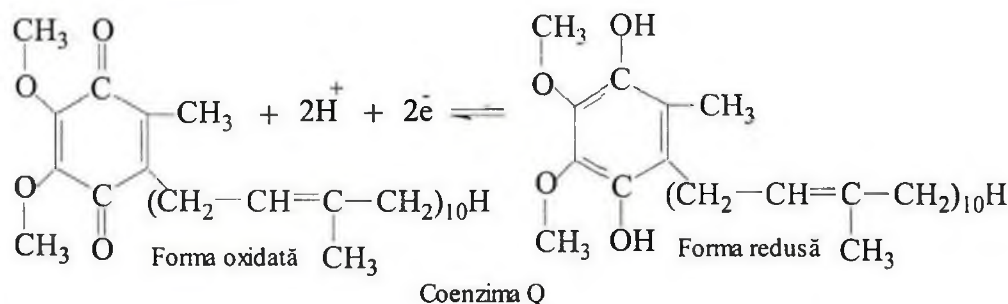


Figura 3.8. *Centrele fiero-sulf*

Coenzima Q sau ubichinona are o răspîndire vastă în sistemele biologice. Coada izoprenică determină capacitățile hidrofobe ale Q, ce permit o difuzie rapidă în membrana internă a mitocondriilor.



Coenzima Q

Coenzima Q, unicul translator al electronilor fixat nerigid de proteină, nu adiționează covalent la ea. Ea îndeplinește funcția de colector, adiționînd echivalentele reduse de la NADH și de la *complexul succinat-Q-reductază* (dependentă de FAD), electronii fiind transferați spre proteinele Fe-S, apoi spre Q. Complexul enzimatic (II) e component integral al membranei interne a mitocondriilor.

Transferul electronilor de la QH_2 mai departe e realizat de proteinele Fe-S și de citocromi (1925, David Keilin). Citocromii sunt proteine ce transferă electroni, molecula lor conținînd hemul ca grupă prostetică. În procesul de transfer al electronilor atomul de Fe se află fie în stare redusă (Fe^{2+}), fie oxidată (Fe^{3+}).

Grupa hemului, asemănătoare cu Fe-S centre, transferă numai un electron. Așadar, molecula de QH_2 transmite 2 electroni ai săi saturați de energie la 2 molecule de citocrom *b*. Citocromii b_l, b, c_l și proteina Fe-S reprezintă *complexul QH_2 — citocrom C reductaza (III)* (fig.3.9.). Valoarea de potențial în cadrul acestui transfer este de 0,21V (ΔG° = -7,75 kcal), ceea ce asigură sinteza unui mol de ATP.

Citocromul *c* transferă electronii de la acest complex la *complexul citocrom C oxidazic (IV)*, ce conține citocromii *a* și a_3. Citocromul C joacă același rol ca și coenzima Q, adică asigură transferul electronilor din diferite complexe ale lanțului respirator (fig.3.10).

Citocromii diferă după structură și proprietăți. Grupa prostetică a citocromului *b*, citocromului c_l, citocromului *c* este protoporfirina IX, hemul constituind aceeași grupă

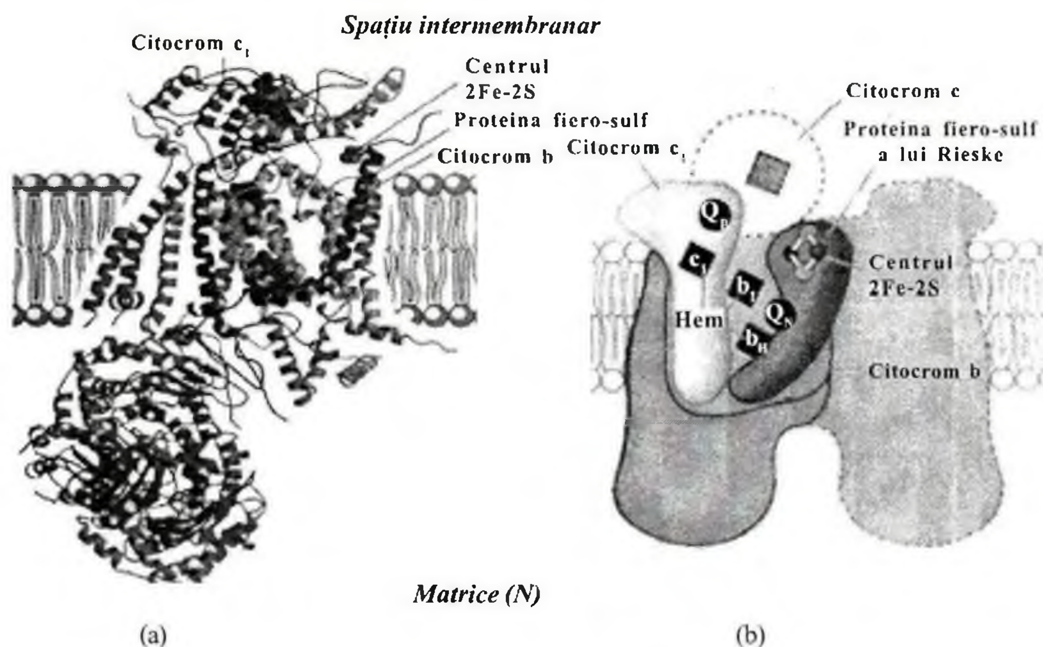


Figura 3.9. *Complexul QH_2— citocrom C reductaza (III). Complexul este un dimer compus din monomeri identici, fiecare cu 11 unități diferite. Structura unui monomer (a). Unitatea funcțională este dimerică (b). Citocromul c_1 și proteina fiero-sulf a lui Rieske proiectată pe suprafața P poate interacționa cu citocromul c în spațiul membranar. Complexul are două situsuri distincte pentru fixarea ubichinonei. Q_N și Q_P, ce corespund situsurilor de inhibiție a două substanțe ce blochează fosforilarea oxidativă. Antimicina A blochează fluxul de electroni de la hem b_H la Q, se leagă la Q_N, aproape de hemul b_H în locusul N(matrice) al membranei. Myxothiazolul previne fluxul electronilor de la QH_2 la proteina fiero-sulf a lui Rieske, se leagă la Q_P, lîngă centrul 2Fe-2S și hem b_L pe partea P a membranei. Structura dimerică este esențială pentru funcția complexului III*

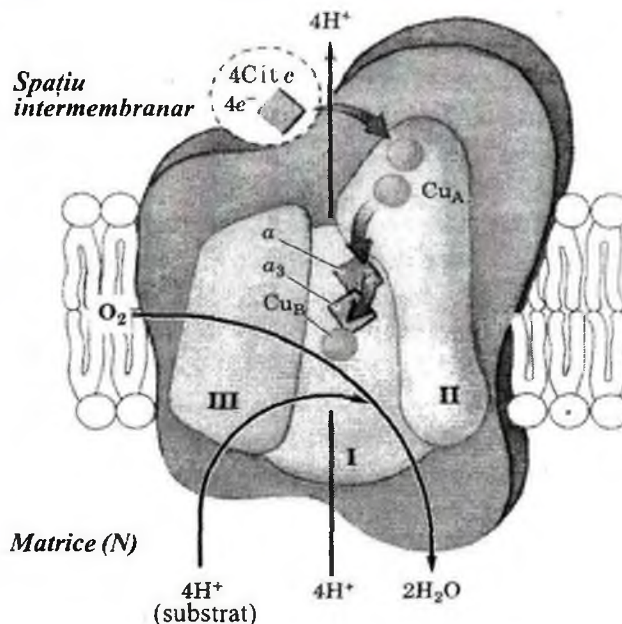


Figura 3.10. *Calea electronilor prin complexul IV. Cele trei proteine implicate în transferul electronilor sunt I, II și III. Transferul de electroni prin complexul IV începe cînd două molecule de citocrom c redus donează fiecare cîte un electron centrului binuclear Cu_A. De aici electronii trec prin hemul a către centrul Fe-Cu (citocromul a_3 și Cu_B). Oxigenul legat la hemul a_3 este redus la derivatul lui peroxid (O_2^{2-}) de doi electroni de la centrul Fe-Cu. Primirea a încă doi electroni de la citocromul c convertește O_2^{2-} în două molecule de apă, consumînd patru «substrat» —protoni din matrice. În același timp, încă patru protoni sunt pompați de la matrice printr-un mecanism încă puțin elucidat*

prostetică ca şi la mioglobină şi hemoglobină. În citocrom *b* hemul nu e legat covalent de proteină, în citocromii *c* şi c_1 — covalent cu legături tioesterice (grupele sulfhidrilice a 2 resturi de cisteină la grupele vinil ale hemului).

Citocromii *a* şi a_3 au altă grupă prostetică (ficroporfirinică), ce se deosebeşte de citocromii *c* şi c_1, avînd grupa formil (în loc de metil) şi un lanț hidrocarbonat (în loc de vinil). Complexul final mai este denumit şi citocrom-oxidaza.

Citocrom C oxidaza prezintă dimer proteic asimetric, în care fiecare monomer e compus din 13 subunități diferite. Ca componenți ai subunităților I sunt 2 heme A, trei atomi, cu raportul Fe/Cu 2:3, un atom de Mg şi Zn şi cîteva molecule de fosfolipide.

Se observă că partea internă a scheletului de α-atomi de carbon a structurii cristalice e compusă dintr-o cantitate vădită de α spirale, ce sunt aranjate în 2 suprafețe paralele, la depărtarea de 50 Å. Acest sector α spiralat prezintă partea proteică transmembranară situată în membrana internă mitocondrială.

E stabilit că primele trei subunități codificate de genele mitocondriale formează nucleul monomerului, celelalte 10 subunități codate de gene nucleare formează spațiul perinuclear (fig.3.11). Funcțiile subunităților I şi II constau în formarea centrelor metalice de oxido-reducere şi a terminațiilor de transfer al protonilor, funcțiile celorlalte subunități sunt discutabile. E confirmat că protonii antrenați în formarea gradientului transmembranar şi în sinteza apei sunt transportați pe căi diferite. Căile efective de transport al H^+ sunt determinate de cavități, în care sunt fixați aminoacizii capabili de formarea legăturii de hidrogen. Alte cavități, orientate haotic, pot conține molecule de apă mişcătoare. Cavitățile pot să-şi îndeplinească rolul la modificările conformaționale ale resturilor de aminoacizi, la inducția lor sub influența proceselor de oxido-reducere sau a modificărilor fixării legăturilor în centrele metalofixatoare.

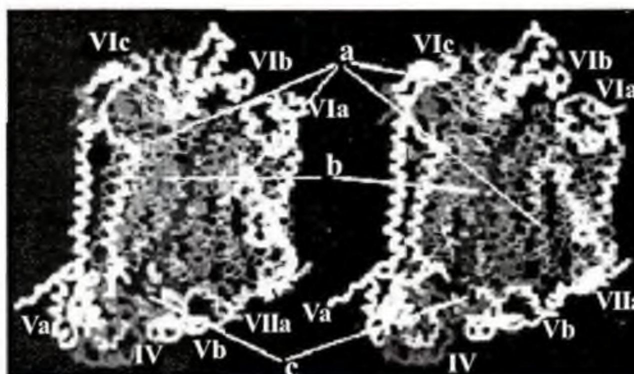


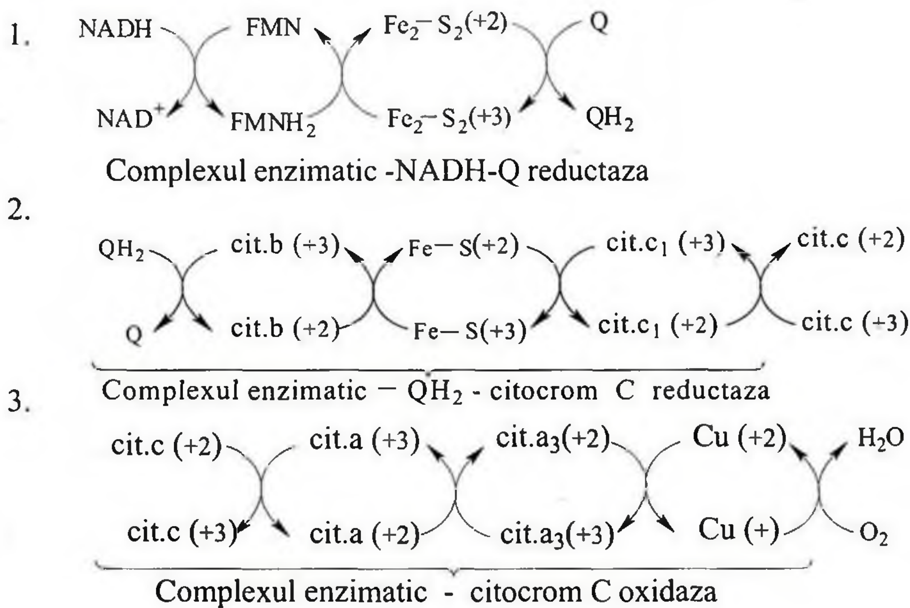
Figura 3.11. ***Organizarea tridimensională în monomer a subunităților codificate de genele nucleare din structura citocromului C oxidazic. Subunitățile codate de genele (a) mitocondriale, b — hemul a şi a_3, c — în fiecare monomer atomii de Cu^{++}***

Controlul riguros la viteza de intrare a oxigenului joacă rolul decisiv la funcționarea enzimei, dacă torentul de e^- e suficient, apoi surplusul de oxigen în centrul de reducere al său favorizează formarea particulelor de oxigen activ. Sunt depistate 2 canale pentru oxigen în subunitatea III şi în hemul A_3. Molecula de oxigen nu poate trece liber prin cavitatea canalelor, ceea ce confirmă controlul riguros al difuziei de oxigen prin ele.

Expulzarea moleculelor de apă sintetizată în centrul de reducere a oxigenului în partea citoplasmică e, de altfel, strict controlată. Sunt depistați aminoacizii hidrofili, aranjați liniar în jurul hemului A_3, şi pînă la atingerea cu subunitățile I şi II se formează o cale hidrofilă — canal posibil pentru apă. Aminoacizii sunt compact aranjați,

așa încît torentul invers al apei e practic imposibil. Analiza RS confirmă lipsa unor alte structuri, ce ar îndeplini această funcție. Modificările conformaționale ale acestor canale sunt induse de modulatorii stărilor de oxido-reducere și ligandofixatoare ale centrului de reducere a oxigenului.

Transferul schematic al electronilor în lanțul respirator este prezentat în felul următor:



Revenind la lanțul respirator, ne-am referi la unele probe ce confirmă faptul că proteinele acestuia funcționează în secvența descrisă mai sus.

a) Valoarea potențialului redox devine pozitiv la deplasarea spre oxigen.

b) Fiecare proteină din acest lanț e specifică numai pentru un anumit donator și un anumit acceptor de hidrogen.

c) Din membrana mitocondrială s-au extras complexe structurale izolate funcțional legate între ele prin transferul de electroni (4 complexe și doi componenți de legătură).

Inhibitorii lanțului respirator. Studiul transferului de electroni s-a facilitat datorită utilizării metodei de inhibiție specifică, ce blochează etapa concretă a procesului (fig.3.5).

1.Complexul I este inhibat de rotenonă (insecticid de origine vegetală folosit de indienii americani ca otravă pentru pești), Na amital - (barbiturat), pericidină (antibiotic), care blochează transferul electronilor pe segmentul $NADH^+$ la coenzima Q.

2.Antimicina A (antibiotic foarte toxic) comportă acțiune de blocaj transportului de electroni între QH_2 și citocromul c.

3.Cianida blochează funcția citocromului aa_3 (aa_3 este blocat și de CO).

4. Complexul II este inhibat de către *malonat,* care acționează ca inhibitor competitiv. Coenzima Q este inhibată de doxorubicina, preparat din clasa antraciclinelor.

5. ATP sintetaza este blocată și de compușii arsenicului, care în forma ionilor de arseniat substitue ionii fosfați, blocînd formarea ATP.

6. Componentele lanțului respirator pot fi inactivate în deficit de fier, deficit al vit. B_2, hipoxie sau prin atacul radicalilor liberi asupra coenzimei Q.

S-a constatat că pînă la fiecare blocaj proteinele sunt mai reduse, iar după blocaj — mai oxidate. Cînd echivalenții de reducere intră în lanțul respirator prin complexul I, se consideră că lanțul funcționează prin "ramura lungă", intrarea prin complexul II se asigură prin "ramura scurtă" (fig.3.5).

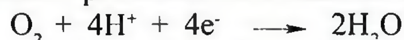
Fluxul de electroni de la NADH la O_2 e un proces exergonic și poate fi exprimat prin:



$$NADH + H^+ + 2O_2 + 3P_i + 3ADP \longrightarrow NAD^+ + 3ATP + 4H_2O \ (-52,6kcal/mol)$$

Trei moli de ATP conțin numai 21,9 kcal/mol. Rezultă că randamentul utilizării energiei libere va fi de 42%. Procesul de transfer al electronilor e cuplat de fosforilarea ADP și sinteza ATP. Potențialul redox în punctele de fosforilare trebuie să fie mai mare decît 0,224V necesar pentru sinteza de ATP. Lanțul respirator e o cascadă, datorită căreia celula acumulează energia liberă eliminată de combustibilul celular într-o formă accesibilă.

Generarea radicalilor liberi. Procesul de transferare a patru electroni finalizează cu formarea apei, însă se știe că hemul transferă numai un electron. Modul încare joncționează patru electroni pentru reducerea moleculei de oxigen nu este distinct:



$$O_2 + 4H^+ + 4e^- \longrightarrow 2H_2O$$

La reducerea incompletă, cu adiția a $2e^-$, se formează apă oxigenată (H_2O_2). La adiția unui electron se formează radicalul superoxid ($:O_2^-$). Ultimele două substanțe sunt toxice și, interacționînd cu restul acizilor grași din lipidele membranare, lezează membranele celulare.

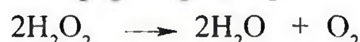
Celulele aerobe se protejează grație acțiunii enzimelor:

1) *Superoxiddismutaza* — enzimă-metal ce transformă superoxidul în H_2O_2:



$$2O_2^- (:O_2^-) + 2H^+ \longrightarrow H_2O_2 + O_2$$

2) *Catalaza* transformă H_2O_2 în H_2O și O_2:



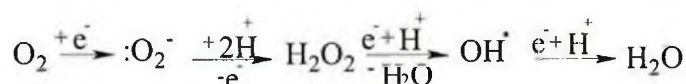
$$2H_2O_2 \longrightarrow 2H_2O + O_2$$

3) *Peroxidaza:*



$$H_2O_2 + RH_2 \longrightarrow 2H_2O + R$$

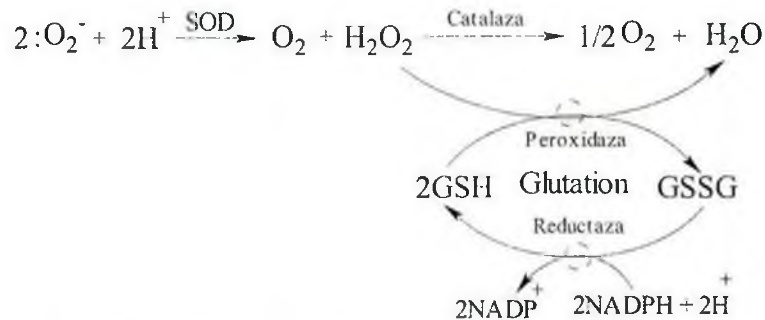
Interacțiunea oxigenului poate evolua în felul următor:



$$O_2 \xrightarrow{+e^-} :O_2^- \xrightarrow[-e^-]{+2H^+} H_2O_2 \xrightarrow[-H_2O]{e^- + H^+} OH^\bullet \xrightarrow{e^- + H^+} H_2O$$

Arsenalul mecanismelor de protejare nu dispune de enzime ce ar neutraliza $OH^\bullet$, dar benefice sunt sistemele de neutralizare a : O_2^- și H_2O_2, sistînd formarea $OH^\bullet$. Deosebit de expuse efectelor nocive ale radicalilor liberi sunt mitocondriile — compartimentul celular unde se efectuează reacțiile de oxido-reducere în prezența oxigenului molecular. Sunt afectate primordial fagocitele și eritrocitele. Deficitul unuia dintre sistemele de protecție celulară are consecințe severe și inposibilitatea de neutralizare a radicalilor liberi este implicată în patogenia diferitelor afecțiuni, ca: ateroscleroza, bolile mitocondriale, bronșitele

cronice, emfizemul pulmonar, cancerul, diabetul zaharat, distrofiile musculare, insuficiența renală, maladiile degenerative neurologice, accidentele cerebrovasculare.



Mecanismele fosforilării oxidative (cuplarea oxidării cu fosforilarea)

Se postulează mai multe ipoteze:

a) Una din ipoteze este că în cadrul procesului de transfer al electronilor are loc formarea unui produs intermediar covalent, macroergic, precursor al ATP (în analogie cu procesele similare).

b) O altă ipoteză presupune că energia oxidării este preluată de o proteină ce se găsește într-o conformație activă, care ulterior stimulează sinteza ATP. Investigațiile n-au confirmat atare ipoteză.

c) Piter Mitchell postulează, în 1961, mecanismul hemiosmotic.

Savantul a presupus că anume cuplarea transferului de electroni și sinteza ATP se datorează gradientului de protoni, ce se stabilește între partea interioară și cea exterioară a membranei interne mitocondriale. Anume transferul electronilor (energia eliberată la transferul lor) pompează H^+ din interior spre exterior, sporind concentrația ionilor H^+ în exterior - regenerează potențialul membranar cu semnul (+).

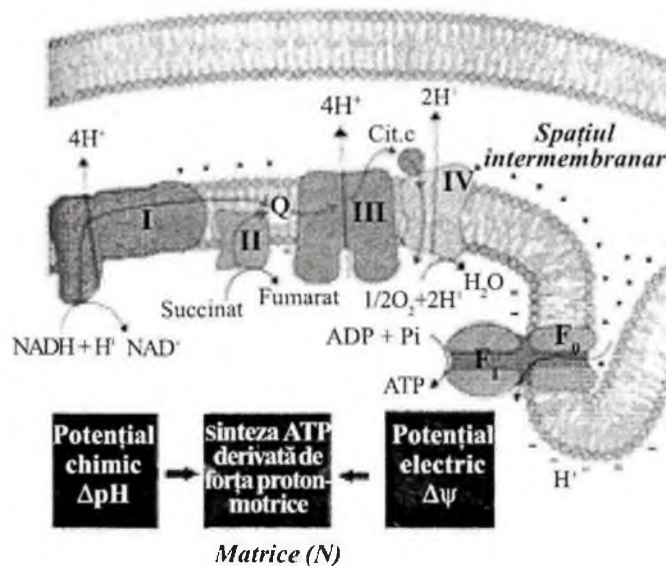


Figura 3.12. *Modelul hemiosmotic. În această simplă prezentare a teoriei hemiosmotice aplicată mitocondriei, electronii din NADH și alt substrat oxidabil trec printr-un lanț de proteine aranjate simetric în membrana internă. Fluxul electronilor este cuplat de transferul de protoni de-a lungul membranei, producînd atît un gradient chimic (ΔpH), cît și un gradient electric(Δψ). Membana internă mitocondrială este impermeabilă pentru protoni; protonii pot reintra în matrice doar prin canalele proton-specifice (F_o). Forța motrice ce conduce protonii înapoi în matrice asigură energia pentru sinteza ATP, catalizată de complexul F_1 asociat cu F_o*

Energia electronilor se stochează, deci, inițial în gradientul protonilor, apoi apare o forță proton-motrice ce condiționează sinteza ATP în complexul enzimatic ATP-azic (fig.3.12.).

Esența generală a mecanismului constă în faptul că actul primar de stocare a energiei îl constituie transferul protonilor prin membrana internă, cu formarea gradientului proton.

Numeroasele date experimentale confirmă conceptul lui Mitchell:

1) S-a confirmat generarea gradientului în cele trei puncte ale lanțului respirator. Gradientul protonic generat în ele se utilizează la sinteza moleculelor de ATP.

2) S-a demonstrat că pH matricei mitocondriale crește, iar a mediului extern al mitocondriilor scade, mediul fiind mai acid.

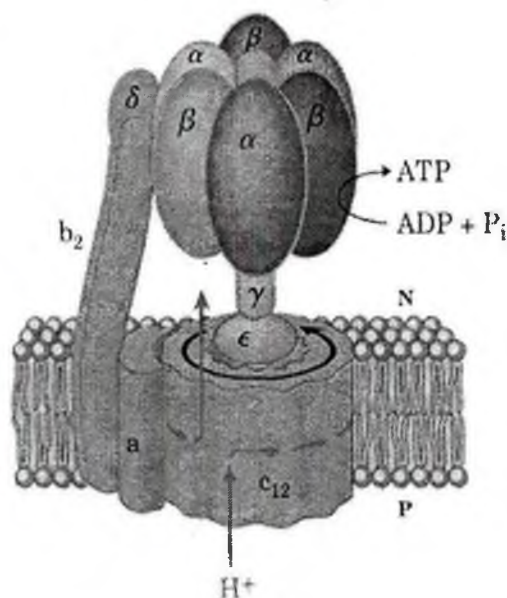


Figura 3.13a. ***Complexul mitocondrial ATP-sintaza***

3) A fost argumentată teza că transferul H^+ din mitocondrii în timpul transferului electronilor și revenirii lor prin moleculele de ATP-sintaza sunt comparabile cu viteza lor din cadrul proceselor de fosforilare oxidativă în mitocondriile intacte.

Teoria hemiosmotică postulează că ionii de H^+ translocați în exterior datorită energiei de transfer a electronilor revin în mitocondrii prin canale speciale, ionice, localizate în *complexul ATP-azic*. Acest flux de protoni este forța motrice care determină sinteza cuplată a ATP din ADP și Pi.

Complexul enzimatic, denumit *ATP-sintaza* sau *F_0F_1-ATP-aza*, se compune din factorii F_0 și F_1. Ultimul se află în matricea mitocondrială. Savantul Efraim Racker l-a izolat și în această stare izolată de F_0 scindează ATP (F_1- ATPaza). Masa moleculară e de 380 kDa și conține nouă subunități incluse în cinci tipuri diferite, fiind joncționate și conținînd cîteva locusuri de fixare pentru ADP și ATP. F_1 e fixată de F_0, aceasta fiind parte componentă a membranei interne, o transversează complet. Zero (nu e decît o literă) înseamnă că această parte a complexului leagă un antibiotic toxic — oligomicina ce simultan inhibă fosforilarea oxidativă.

Structura complexului F_0F_1, dedusă prin studii biochimice și cristalografice de John E.Walker, este redată în fig 3.13a. În F_1 trei subunități α si 3 β sunt aranjate precum feliile alternate ale unei portocale. În centru se află subunitatea γ. Cele două subunități β ale F_0 se asociază ferm cu subunitățile α și β ale F_1, menținîndu-le strîns lîngă membrană. În F_0 cilindrul membranar al subunităților c este atașat la subunitățile γ_2 și ε ale lui F_1. În timp ce protonii «curg» prin membrană din direcția P spre N - via F_0, complexul cilindric se rotește și subunitățile β F_1 își schimbă conformația; subunitatea γ se asociază cu fiecare în parte.

În fig. 3.13b este redată conformația lui F_1, văzută din direcția N membranară, cu cele trei subunități β și 3 α la periferie și subunitatea γ în centru. Pe fiecare subunitate β, la interfața ci cu α, este prezent un site de legare nucleotidic. Subunitatea γ se asociază primar cu una din cele trei perechi αβ, forțînd trecerea lor în diferite conformații cu generare de ATP.

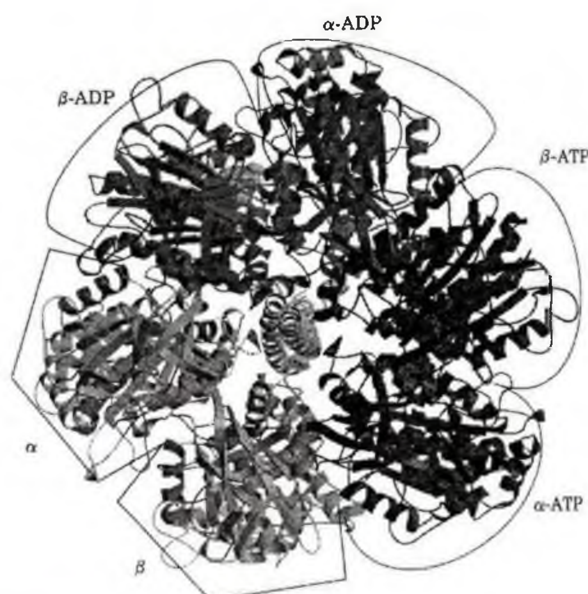


Figura 3.13b. ***Conformația complexului F_1, văzută din direcția N membranară***

În cursul evoluției, s-au dezvoltat cîteva tipuri de transportatori activi ATP-dependenți, diferențiindu-se în structură, mecanism, localizarea în țesuturi specifice și compartimente intracelulare (vezi tab.3.1)

ATP-azele de tip P sunt transportatori ai ATP-ului ce conduc cationii fosforilați reversibil de către ATP, ca parte a ciclului de transport. Toate ATP-azele de transport de tip P au asemănări în secvența aminoacidică, mai ales în apropierea reziduului Asp ce suferă fosforilare, și toate sunt sensibile la inhibiție de către analogul fosfat – *vanadatul*. Fiecare este o proteină integrală cu multiple regiuni de „deschideri" membranare într-un singur polipeptid, unii avînd și o a doua subunitate (fig.3.14a).

Transportatorii de tip P sunt larg răspîndiți. În țesuturile animale, Na^+, K^+- ATP-aza, un anticonductor pentru Na^+, K^+; Ca^{2+}- ATP-aza, un uniconductor pentru Ca^{2+}. Tipul P al ATP-azei menține dezechilibrul în compoziția ionică dintre citozol și mediul extracelular. Celulele parietale ale stomacului mamiferelor au o ATP-ază de tip P ce pompează H^+ și K^+ de-a lungul membranei plasmatice, deci acidifică și conținutul stomacal. La plantele superioare, ATP-aza de tip P pompează protonii afară din celulă, stabilind o diferență de 2 unități pH și 250mV de-a lungul membranei plasmatice.

O ATP-ază de tip P similară din mucegaiul pîinii, *Neurospora*, pompează protonii din celulă pentru a stabili un potențial negativ pe partea internă a membranei, utilizat pentru a conduce aportul de substraturi și ionii din mediul înconjurător prin transport activ secundar. Bacteria folosește ATP-aza de tip P pentru a pompa în afară ionii metalelor grele, precum și Cd^{2+}, Cu^{2+}.

Tabelul 3.1. *Localizarea, tipul de membrană şi rolul celor patru tipuri de transportatori ATP-azici*

	Organism sau ţesut	Tip de membrană	Rolul
ATP-azele de tip P			
Na^+K^+	Ţesuturi animale	Plasmă	Menţine scăzut Na^+, ridicînd K^+ în interiorul celulei, crează potenţial transmembranar electrolitic
H^+K^+	Celule acid-secretorii (parietale)ale mamiferelor	Plasmă	Acidifiază conţinutul stomacal
H^+	Fungi (Neurospora)	Plasmă	Crează gradientul FT pentru a dirija transportul secundar extracelular în interiorul celulei
H^+	Plante superioare	Plasmă	
Ca^{2+}	Ţesuturi animale	Plasmă	Menţine Ca^{2+} scăzut în citozol
Ca^{2+}	Miocite animale	Reticulul endoplasmatic	Sechestrează Ca^{2+} intracelular, menţinînd Ca^{2+} scăzut în citozol
Cd^{2+}, Hg^{2+}, Cu^{2+}	Bacterii	Plasmă	Pompează ionii metalelor grele din celule
ATP-azele de tip V			
H^+	Animale	Vezicule secretorii, lizozomale, endozomale	Crează un pH mic în compartiment, activînd proteazele şi alte enzime hidrolitice
H^+	Plante superioare	Vacuolar	
H^+	Fungi	Vacuolar	
ATP-azele de tip F			
H^+	Eucariote	Partea internă a mitocondriei	Catalizează formarea de ATP din ADP + Pi.
H^+	Plante superioare	Tilacoid	
H^+	Procariote	Plasmă	
Transportatori multimedicamentoşi			
	Celule animale tumorale	Plasmă	Îndepărtează o mare varietate de produse naturale hidrofobe şi droguri sintetice din citozol, inclusiv vinblastina, doxorubicina, actinomicina D, mitomicina, taxolul, colchicina, puromicina

O clasă diferită de ATP-aze responsabile de transportul ionilor este corelată cu acidifierea compartimentelor intracelulare la multe organisme. Vacuolele fungilor şi ale unor plante superioare menţin un pH între 3 şi 6, cu mult sub cel ce înconjoară citozolul (pH=7,5), prin activitatea ATP-azei de tip V – pompă de protoni. ***ATP-azele de tip V*** (V de la vacuole) sunt responsabile şi de acidifierea lizozomilor, endozomilor, complexului Golgi şi veziculelor secretorii din celulele animale.

Structural, nu sunt înrudite cu ATP-azele de tip P, nu suferă fosforilarea ciclică şi defosforilarea, şi nici nu sunt inhibate de vanadat. Toate ATP-azele de tip V au o structură complexă similară, cu un domeniu integral (transmembranar) (V_0) ce serveşte drept canal protonic, şi un domeniu periferic (V_1) ce conţine site-ul ATP de legare şi activitatea ATP-azică (fig.3.14.b). Mecanismul prin care ATP-aza de tip V cuplează ATP – hidrolizarea pînă la transportul protonic, nu este încă pedeplin cunoscut. Pompele protonice de tip V sunt asemănătoare structural şi, probabil, ca mecanism, cu o a treia familie de pompe protonice, ATP-azele de tip F.

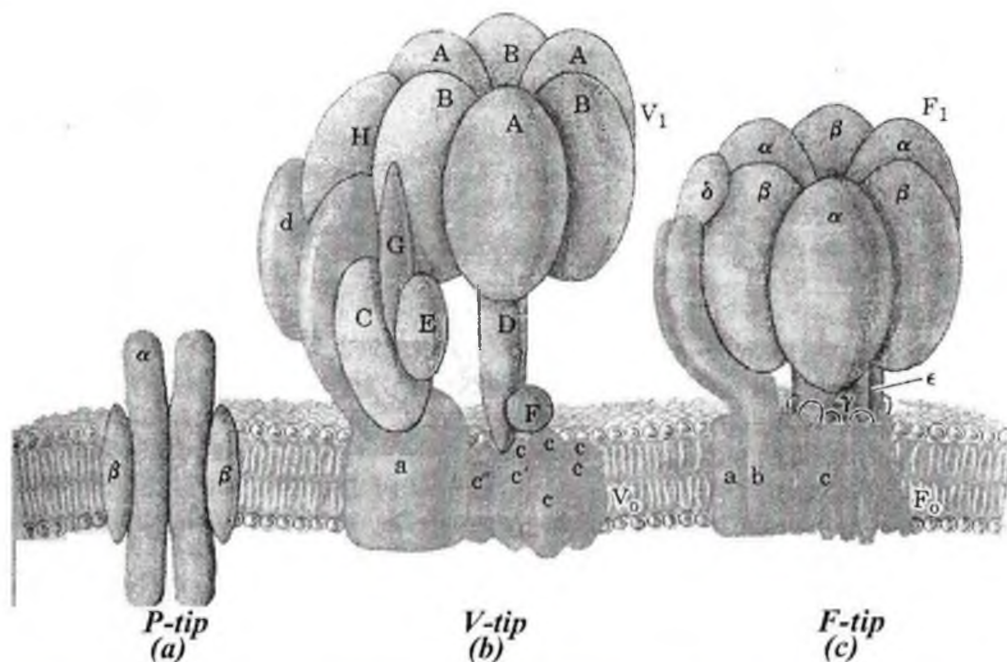


Figura.3.14. ***Structura subunitară a trei tipuri de ATP-aze transportatoare.***
a) ATP-azele de tip P au, în general, două tipuri de subunităţi proteice integrale. Subunitatea a care este esenţială, are un reziduu Asp fosforilat în timpul transportului medicamentelor.
b) ATP-azele de tip V au un domeniu periferic V_1, compus din 7 tipuri diferite de subunităţi, incluzînd trei A şi trei B, şi un domeniu integral V_0, cu trei tipuri de subunităţi ce includ multiple copii ale lui c.
c) ATP-azele de tip F au un domeniu periferic F_1 omolog cu V_1 al ATP-azelor de tip V. Porţiunea integrală a ATP-azelor de tip F, F_0, de asemenea are trei tipuri de subunităţi cu multiple copii ale lui c. Pompele de tipul P, cum ar fi Na^+, K^+, ATP-aza mişcă doi ioni în direcţii opuse. Pompele de tip V şi F mişcă protonii într-o direcţie.

ATP-azele de tip F joacă un rol central în reacţia de conservare a energiei la bacterii, mitocondrii şi cloroplaşti. Ele catalizează trecerea transmembranară a protonilor, condusă

prin hidrolizarea ATP, ca şi reacţia inversă în care fluxul de protoni determină sinteza ATP (fig.3.14c). În al doilea caz, ATP-azele de tip F sunt denumite ATPsintaze. Gradientul protonic în fosforilarea oxidativă şi fotofosforilare este stabilit de o altă categorie de pompe protonice ce au ca sursă substratul oxidativ sau lumina solară. ATP-azele de tip F/ATP-sintazele sunt complexe multisubunitare ce asigură pori transmembranari (proteina integrală F_0) pentru protoni şi molecule (proteina periferică F_1),ce fololsesc energiea eliberată din protoni (F_0) pentru a forma punţi fosfoanhidridice de ATP. Sintetizarea ATP şi activitatea ATP-azică se află în proteina F_1 (fig.3.14c).

La mijlocul anilor 1980 a devenit evident că unele tumori sunt rezistente la un număr de compuşi antitumorali. Investigaţiile au arătat că membranele plasmatice ale acestor tumori conţin un transportator – ATP-dependent ce poate exporta mulţi compuşi medicamentoşi diferiţi, prevenind acumularea lor în celulele tumorale şi efectele lor de inhibiţie tumorală. Medicamentele transportate diferă chimic, dar sunt hidrofobe. Transportatorii de medicamente prezintă o proteină integrală, cu masa moleculară de 170 kDa, 12 segmente membranare şi două site-uri de legare a ATP-ului. Ele sunt responsabile de eliminarea medicamentelor din citozolul celulei tumorale. Exportul de medicamente are loc prin hidrolizarea ATP-ului. Transportatorii de medicamente sunt, de asemenea, şi canale ionice, care favorizează în mod specific trecerea Cl^- la diminuarea gradientului de concentraţie independent de ATP. În boala genetică *fibroză cistică* defectul determinant este în gena care decodează o proteină transportatoare de Cl^- (reglator transmembranar CFTR), ce poate fi înrudită cu transportatorul de medicamente în celulele tumorale.

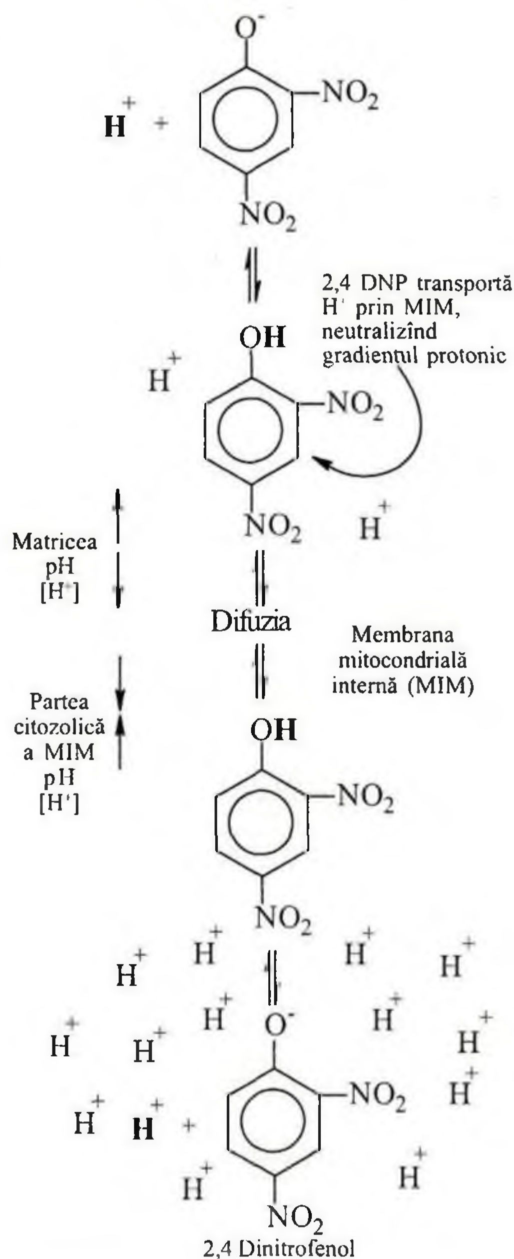


Figura 3.15. ***Influenţa DNP la transportul de H^+ în mitocondrii***

Decuplanții fosforilării oxidative

La fosforilarea oxidativă contribuie:

a) integritatea membranei interne a mitocondriilor – orice leziune conduce la pierderea capacității de fosforilare oxidativă, în timp ce transferul electronilor poate continua. Fără integritatea membranei interne, gradientul de H^+ n-ar putea exista;

b) impermeabilitatea membranei interne pentru ionii H^+, OH^-, K^+, Cl^-. Dacă ar fi permeabilă, procesele de fosforilare oxidativă nu ar avea loc.

Procesele fosforilării oxidative pot fi decuplate cu ajutorul unor substanțe chimice ce inhibă fosforilarea ADP, neafectînd transferul electronilor – agenți decuplanți. Energia nu se acumulează în ATP, ci doar trece în căldură. Decuplanții măresc permeabilitatea la H^+(*protonofori*). Ca substanțe lipofile, ei leagă ionii de o parte a membranei și-i transferă pe cealaltă, unde concentrația lor e mai mică (fig.3.15).

Mulți agenți decuplează procesul fosforilării oxidative - decuplantul clasic e 2,4-dinitrofenol (decuplează oxidarea de fosforilare). La fel, drept decuplanți pot servi unele hidrazone, izotiocianați etc.

Acest fenomen are drept scop și menținerea homeostazei termice – energia *neutilizată ce se disipează sub formă de căldură. Procesele respective decurg intensiv în* țesuturile adipoase brune, saturate în mitocondrii, cu un conținut mare de citocromi. Asemenea țesuturi caracterizează animalele care hibernează; de altfel, le posedă și nou-născuții. În calitate de decuplanți servesc acizii grași, eliminarea cărora e reglată de adrenalină.

Altă grupă de substanțe sunt *ionoforele* care leagă și transferă ionii prin membrană – Valinomicina (K^+), Gramicidina (Na, K, și alți ioni monovalenți).

S-a constatat că sub acțiunea noradrenalinei eliberată la nivelul terminațiilor nervoase simpatice, se sintetizează o proteină decuplantă – *termogenina*. Efectul ei are loc în țesutul adipos brun, dezvoltat la nou-născut, cît și la mamiferele care hibernează. Frigul sau o alimentare abundentă eliberează termogenina, care decuplează fosforilarea oxidativă, cu producerea de căldură. Efectul calorigen e caracteristic și hormonilor tiroidieni, care în final modifică permeabilitatea membranei mitocondriale pentru protoni, împiedicînd generarea gradientului electrochimic.

Dar multe nuanțe ale mecanismelor fosforilării oxidative nu sunt elucidate. De exemplu, nu se știe:

1. Care anume este mecanismul ce facilitează lanțul de transfer al electronilor – pomparea H^+ din matrice în exterior?

2. De unde se iau acești protoni? Fie că sunt cei care participă direct la reacțiile chimice catalizate de enzime, reprezentînd o cale nemijlocită de la NADH, alta – din soluție sau, indirect, la interacțiunea conformațională între centrele catalitice și de fixare în diferite porțiuni ale complexului enzimatic.

În 1988, M.Hartmut a expus argumente incontestabile în favoarea teoriei lui Mitchell, în urma studierii cristalelor proteinei membranare din complexul clorofil – proteină a unor bacterii. Cu ajutorul analizei roentgenostructurale, a demonstrat că sub acțiunea luminii electronii se desprind de la substrat și se deplasează de la un complex la altul. Golul rămas în proteina dată este compensat de transferul următorului electron de

la proteina precedentă (fig.3.16).

La scindarea ATP în citozol, se formează ADP^{3-} şi P^{2-}. *Care este mecanismul de transfer al ADP în mitocondrii şi cum ATP sintetizat va părăsi mitocondriile?*

Se ştie că membrana mitocondrială e impermeabilă pentru substanţe ionizate. Membrana internă conţine două sisteme specifice de transport: adeninnucleotid translocaza, cu funcţia de transfer al ADP^{3-} din citozol în mitocondrii, în schimb de ATP^{4-}, în direcţie inversă (1:1).

Transferul are loc datorită modificărilor conformaţionale ale moleculei AN-translocazei, ce reprezintă o proteină foarte specifică. Se cunoaşte un inhibitor al ei – *antractilozidul,* secretat de o plantă (ciulin sau scaiete). Al doilea sistem specific e fosfattranslocaza, cu funcţia de transportator al fosfatului în mitocondrii, însoţit de deplasarea ionilor de hidrogen.

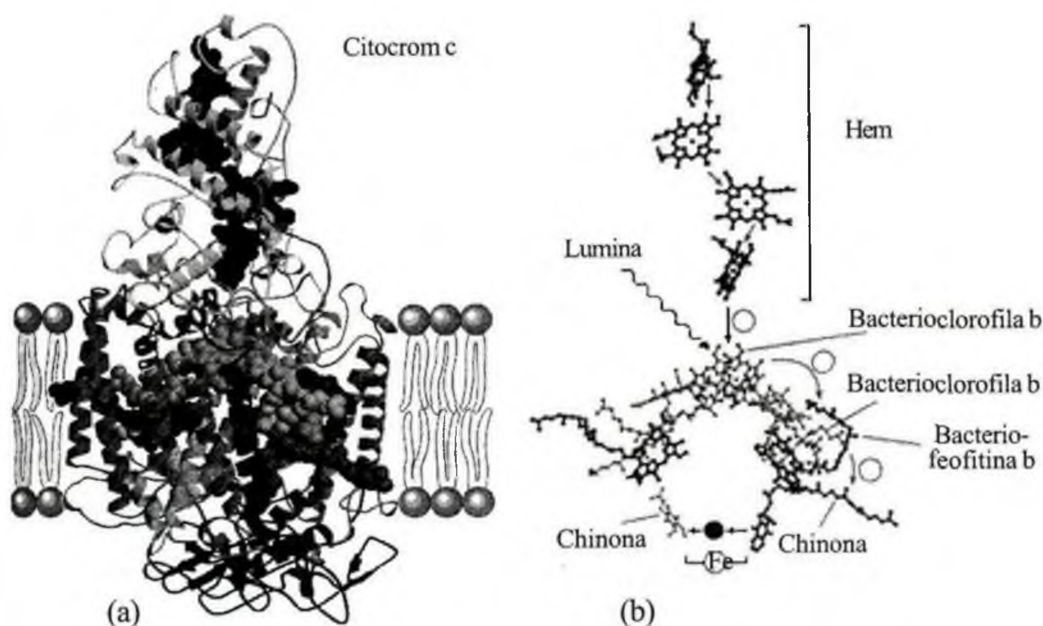


Figura 3.16. ***Modelul tridimensional (a) şi aranjarea spaţială a cofactorilor în interiorul modelului pentru proteinele centrului fotoreactant în bacteriile Rhodopsendomonas viridis (b)***

Bolile mitocondriale

Mutaţiile genelor care codifică proteinele sau moleculele de RNA mitocondrial cauzează bolile mitocondriale mult mai semnificative în patologia generală, pe măsura evoluţiei cunoştinţelor actuale despre funcţionarea normală a mitocondriilor. Proteinele mitocondriale pot fi codificate de gene nucleare (fiind importate în mitocondrii după ce au fost sintetizate în citoplasmă) sau de gene din DNA mitocondrial. Bolile mitocondriale pot fi cauzate de anomalii ale unuia din complexele din membrana internă (antrenînd un deficit energetic important), de anomalii ale ribozomilor şi ale biosintezei intramitocondriale

a proteinelor, de anomalii ale transporturilor din membranele mitocondriale etc.

Cele mai importante particularităţi ale acestor afecţiuni sunt:

a) transmiterea mendeliană, dacă mutaţia afectează o genă nucleară;

b) transmiterea matriliniară (exclusiv pe linie maternă), dacă mutaţia afectează o genă a DNA mitocondrial, deoarece DNA mitocondrial este transmis pe linie maternă;

c) segregarea replicativă, care constă în repartiţia aleatorie a mitocondriilor afectate şi ale celor normale în urma diviziunii celulare, ceea ce antrenează un mozaicism tisular (exprimarea diferenţiată a simptomatologiei în funcţie de ţesut sau chiar în cadrul aceluiaşi ţesut);

d) acumularea progresivă a mutaţiilor în DNA mitocondrial ca urmare a atacului radicalilor liberi produşi prin funcţionarea lanţului respirator. După atingerea unui anumit nivel al anomaliilor induse de radicalii liberi, apare expresia clinică a afecţiunii, în primul rînd în organele dependente de un aport constant de energie (miocardul, muşchiul scheletic, sistemul nervos).

Citopatiile mitocondriale

Anomaliile sau deficitul total al proteinelor din lanţul respirator sunt denumite genetic *citopatii mitocondriale.* Acestea sunt cauzate de deficitul ereditar al unuia dintre complexele enzimatice respiratorii. Simptomatologia debutează precoce, încă în perioada neonatală în cazul deficienţelor grave sau, ulterior, în cazul în care activitatea enzimatică reziduală permite sinteza unui număr mic de molecule de ATP. Tabloul clinic depinde de gradul de afectare a mitocondriilor din diferite ţesuturi, deoarece nu toate celulele aerobe sunt în egală măsură purtătoare ale anomaliilor mitocondriale. Ţesuturile cele mai afectate sunt cele cu necesităţi energetice maximal, în primul rînd sistemul nervos, miocardul şi muşchiul scheletic. Frecvent, pacienţii prezintă semne de encefalopatie metabolică, cardiomiopatii, hipotonie severă, steatoză hepatică, insuficienţă renală, etc. Pe plan bioumoral predomină acidoză lactică consecutivă inhibării retroactive a ciclului Krebs şi conversiei piruvatului în lactat. O altă modificare caracteristică este accentuarea cetogenezei cauzată de creşterea nivelului cetonemiei şi a raportului β-hidroxibutirat/ acetoacetat (deoarece β-hidroxibutirat dehidrogenaza este activată la creşterea raportului $NADH/NAD^+$).

Cele mai frecvente afecţiuni cauzate de disfuncţii ale proteinelor sau ale RNA mitocondrial sunt:

a) sindromul OXPHOS care reuneşte afecţiunile cauzate de disfuncţia unuia dintre complexele lanţului respirator;

b) sindromul MERRF, afecţiune neurodegenerativă produsă de prezenţa unei mutaţii în gena mitocondrială care codifică tRNA-Lys, ceea ce condiţionează perturbarea biosintezei tuturor proteinelor mitocondriale;

c) sindromul MELAS, afecţiune neurodegenerativă fatală, produsă de prezenţa unei mutaţii în gena mitocondrială pentru un alt tip de RNA de transfer $(tRNA^{leu})^{-UUR}$.

Anomaliile mitocondriale secundare

Anomaliile mitocondriale secundare sunt cauzate de diminuarea aportului tisular de oxigen (anoxie sau hipoxie în insuficienţele respiratorii ori cardiocirculatorii severe) sau de intoxicaţiile cu agenţi care blochează complexele mitocondriale. Drept exemplu ar

servi monooxidul de carbon sau cianurile care blochează ireversibil complexul IV, prin stabilizarea formei fierice a ionului de fier.

Sistemele - navetă de transport al echivalenților de reducere

Este evident că $NADH^+ + H^+$ care se produce la nivelul mitocondriilor, se reoxidează prin pătrunderea în lanțul respirator. Dar care este soarta celui ce generează în citoplasmă, doar mitocondriile intacte sunt impermeabile pentru NAD(P)? Reoxidarea va decurge pe căi indirecte denumite sisteme "navete", fiind indispensabile de funcționarea căilor metabolice citozolice. Prin membrană vor fi transferați nu NADH, dar numai electronii lor. Primul mecanism e naveta "glicerol-fosfat", ce operează în ansamblu astfel: NADH și H^+ rezultat din diverse reacții de reducere din citoplasmă se asociază cu apoenzima specifică, formînd glicerol-3-P-dehidrogenaza (fig.3.17). Drept acceptor servește DHAP (dihidroxiacetonfosfatul - intermediar glicolitic). Membrana externă mitocondrială este permeabilă pentru glicerol-3-fosfat care difuzează cu ușurință în spațiu intermembranar. Pe suprafața externă a membranei interne mitocondriale este localizată G-3-P-DH mitocondrială, care-l reoxidează (glicerolfosfatul) în DHAP, iar cei doi atomi de H sunt preluați de coenzima acestei enzime de tip flavinic (FP). Hidrogenii sunt preluați la această enzimă prin intermediul CoQ în lanțul respirator. DHAP revine în citoplasmă și suita de reacții se reia. Mecanismul menține în citoplasmă o concentrație necesară de NAD^+. Procesul e deosebit de activ în mușchii scheletali și creier.

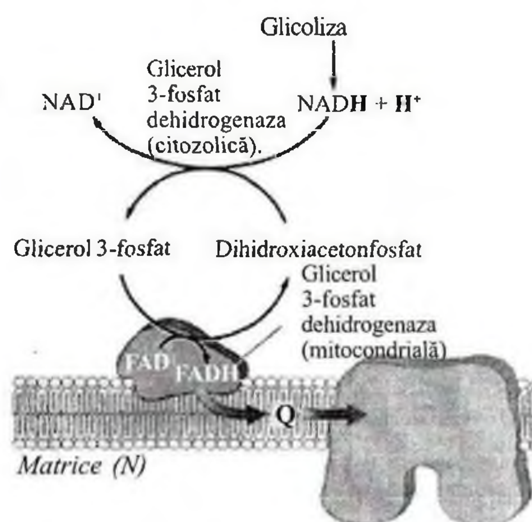


Figura 3.17 *Mecanismul-navetă glicerol 3-fosfat*

E mai complicat mecanismul de transfer al H^+ la naveta "malat- aspartat" (fig.3.18). În schema respectivă, 2,5 indică sisteme de transfer al aminoacizilor, dicarboxilaților. Acest mecanism funcționează intens în inimă, ficat, rinichi. Astfel, se asigură reoxidarea NADH citozolic și reglarea cuplurilor $NADH/NAD^+$ extra și intra mitocondriale. Naveta dată cedează electroni în lanțul respirator, formînd 3ATP.

Naveta malat-aspartat include următoarele sisteme enzimatice și de transport:

- malat dehidrogenaza (MDH) cu izoformele sale – citozolică și mitocondrială;
- aspartatamino transferaza (AST), de asemenea citozolică și mitocondrială;
- transportătorii, care funcționează ca sisteme antiport – malat-cetoglutarat și aspartat - glutamat.

Echivalenții reducători ($NADH+H^+$) citozolici sunt preluați de MDH și utilizați pentru reducerea oxaloacetatului în malat. Ultimul este transportat în mitocondrii și retransformat în oxaloacetat grație acțiunii MDH mitocondriale. $NADH+H^+$ mitocondrial este preluat

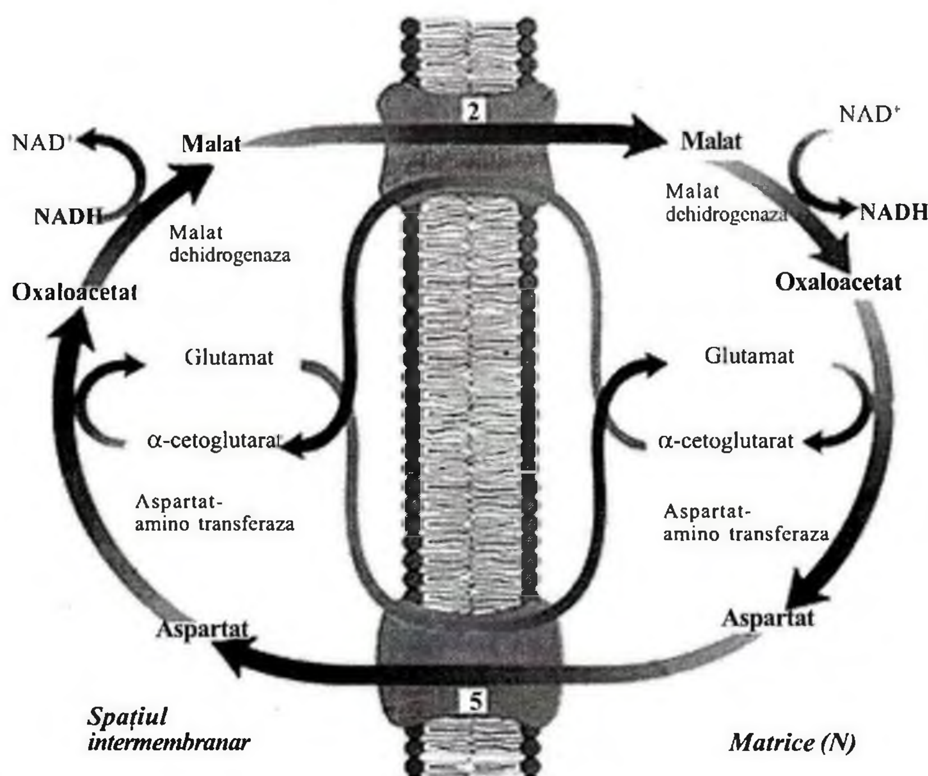


Figura 3.18 ***Mecanismul-navetă malat-aspartat***

ca substrat al complexului I. Oxaloacetatul este transaminat sub acțiunea AST, generînd acidul aspartic, care ulterior este trasportat în citozol prin intermediul transportatorului comun aspartat-glutamat. AST citozolică regenerează oxaloacetatul prin transaminarea aspartatului. Ciclul glutamat-aspartat furnizează oxaloacetatul necesar funcționării navetei în cauză.

Reglarea fosforilării oxidative

Intensitatea fosforilării oxidative este riguros controlată. Un anumit control se poate exercita prin compuși și factori direct implicați în proces. Rolul major îi revine lui ADP ce se cuplează cu P, formînd ATP. Controlul se exercită:

a) Prin *acceptor fosfat* exprimat prin mărimea P/O (denumit și cît de fosforilare). El reprezintă numărul de molecule de fosfor neorganic, transformat în formă organică, cu referire la atomul de *oxigen* utilizat, (respectiv, pentru cele trei puncte de fosforilare e egal cu 3 : 2 : 1).

b) Electronii se deplasează prin lanțul respirator, cu condiția fosforilării simultane a ADP în ATP. Conținutul de ADP determină viteza de fosforilare oxidativă. La sporirea ei, viteza maximă de utilizarea O_2 durează atîta timp, cît ADP se transformă în ATP, apoi revine la valoarea inițială. Reglarea fosforilării oxidative prin ADP se numește *control respirator*, care depinde direct de necesitățile energetice ale celulei.

c) Fosforilarea oxidativă e reglată și de *sarcina energetică* celulară (vezi mai sus).

Oxigenazele. Citocromul P_{450} şi reacţiile de oxido-reducere. Aproape 90% din O_2 este redus de complexul citocromoxidazic aa_3. Unele ţesuturi conţin enzime ce catalizează reacţii de oxido-reducere în care atomii de oxigen se includ nemijlocit în molecule şi formează grupa OH sau carboxilică – COOH. Enzimele ce catalizează tipul dat de reacţii se numesc *oxigenaze.*

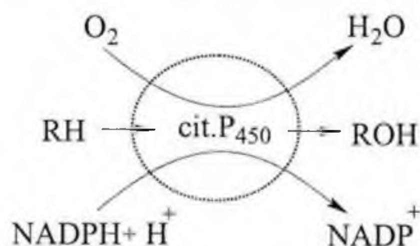
Dioxigenazele sunt enzime ce catalizează reacţii care includ în molecula substratului organic ambii atomi de O_2, exp: pirocatehaza. *Monooxigenazele* reprezintă enzime ce catalizează reacţii de includere a unui atom de O_2, celălalt fiind redus la H_2O. Aceste enzime necesită două substraturi – unul adiţionează un atom, iar al doilea – cosubstratul este donator de H pentru reducerea atomului de O_2 la H_2O:



$$AH + BH_2 + O_2 \longrightarrow AOH + B + H_2O$$

Primul substrat se hidroxilează, de aceea enzimele sunt denumite şi hidroxilaze; monooxigenazele se divizează în subclase în dependenţă de natura cosubstratului (FMN, FAD, NAD, NADP, α-cetoglutarat).

Numeroase şi complexe sunt reacţiile de oxido-reducere, cu participarea citocromului P_{450} (prezent în reticulul endoplasmatic). Acest citocrom poate interacţiona cu O_2 şi cu CO, formînd cu ultimul un complex ce absoarbe lumina la 450 nm.



Citocromul P_{450} catalizează reacţiile de hidroxilare a substratului (RH $\longrightarrow$ ROH), iar celălalt se reduce la H_2O, adiţionînd echivalenţi reduşi ai NADH, NADPH sau proteine fiero-sulf.

Participă la: **1)** hidroxilarea steroizilor; **2)** inactivarea substanţelor străine, mai ales puţin solubile în apă; **3)** hidroxilarea medicamentelor – hidroxilare ce amplifică solubilitatea lor, favorizînd procesele de dezintoxicare şi eliminare din organism.



P.Mitchell



J. E.Walker

CAPITOLUL IV. GLUCIDELE ŞI METABOLISMUL LOR

STRUCTURA. PROPRIETĂŢILE. FUNCŢIILE

Glucidele reprezintă axa metabolică în regnul vegetal, pentru sinteza cărora se utilizează energia luminii. Ele reprezintă forma de existenţă a majorităţii organismelor, deoarece glucidele de felul zahărului, amidonului sunt sursa principală de calorii necesare omului adult, tuturor animalelor şi multor bacterii.

Glucidelor le revine funcţia fundamentală de aprovizionare cu energie şi carbon a celulelor incapabile de fotosinteză, iar unele, ca amidonul şi glicogenul, reprezintă rezerva de glucoză.

Polimerii glucidici insolubili îndeplinesc funcţii structurale în pereţii celulari ai bacteriilor, plantelor, în ţesutul conjunctiv şi în membranele celulare animale.

Un alt tip de glucide servesc la interacţiunea celulelor, determinînd specificitatea biologică a suprafeţelor celulelor animale. Glucidele sunt componente ale acizilor nucleici.

Majoritatea reprezentanţilor acestei clase de substanţe organice sunt compuşi ai carbonului interacţionat cu apa $(CH_2O)_n$. Există însă şi glucide care nu respectă acest raport, iar unele dintre ele conţin atomi de azot, fosfor sau sulf.

În funcţie de comportarea lor la hidroliză, glucidele se clasifică în:

1) *oze* – monozaharide, glucide nehidrolizabile, substanţe incolore, solide, cristalice, uşor solubile în apă, de regulă, dulci. Baza lor reprezintă un lanţ neramificat de atomi de carbon legaţi între ei prin conexiuni ordinare. Unul dintre aceşti atomi e fixat printr-o legătură dublă cu O_2, formînd grupa carbonil. La ceilalţi atomi de carbon e adiţionată grupa hidroxilică. În funcţie de natura grupei şi carbonul pe care îl conţin, deosebim aldoze (C=O la capătul terminal, ca grupă aldehidică) şi cetoze (C=O în orice altă poziţie). După numărul diferit de atomi de carbon în molecula lor distingem: trioze, tetroze, pentoze, hexoze etc.(vezi pag. 215).

2) *ozide* – glucide care prin hidroliză pun în libertate una sau mai multe molecule de oze (holozide); unele din ele eliberează un compus în plus de natură neglucidică (numit aglicon) şi se numesc heterozide (glucozide).

Fiecare monozaharid există în două forme, alcătuind în natură *aldo-* sau *cetoforma*. Cele mai răspîndite sunt hexozele (D-glucoza, D-fructoza). Aldopentozele (D-riboza şi 2-dezoxi-D-riboza) sunt componente ale acizilor nucleici.

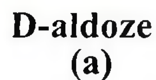
Toate monozaharidele, cu excepţia dihidroxiacetonei, posedă unul sau mai mulţi atomi chirali de carbon şi se atestă sub formă de izomeri optici activi: gliceraldehida conţine un atom chiral şi poate fiinţa în formă de doi stereoizomeri; aldohexozele au 2^4, adică 16 izomeri. Stereoizomerii se deosebesc prin modul în care rotesc planul luminii polarizate, denotînd aceleaşi proprietăţi fizice şi chimice. Stereoizomerii se numesc enantiomeri şi sunt situaţi unul faţă de celălalt, la fel ca reflectarea oricărui obiect în oglindă. Prin convenţie, ei au fost desemnaţi D şi L. Configuraţia absolută a celor patru substituenţi în jurul carbonului asimetric stabilită prin studii de difracţie a razelor X este redată prin formule de perspectivă şi plane; ca compus de referinţă este luată gliceraldehida (GA):

Trioze | **Tetroze**

D-gliceraldehida:
H–C=O
H–C*–OH
CH_2OH

D-eritroza:
H–C=O
H–C*–OH
H–C*–OH
CH_2OH

D-treoza:
H–C=O
HO–C*–H
H–C*–OH
CH_2OH



P e n t o z e

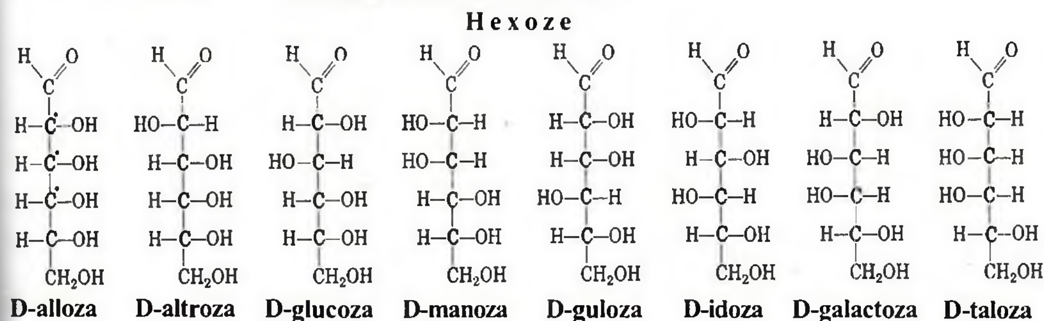
D-riboza:
H–C=O
H–C*–OH
H–C*–OH
H–C*–OH
CH_2OH

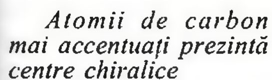
D-arabinoza:
H–C=O
HO–C*–H
H–C*–OH
H–C*–OH
CH_2OH

D-xiloza:
H–C=O
H–C*–OH
HO–C*–H
H–C*–OH
CH_2OH

D-lixoza:
H–C=O
HO–C*–H
HO–C*–H
H–C*–OH
CH_2OH

H e x o z e





Treoze | **Tetroze** | **P e n t o z e**

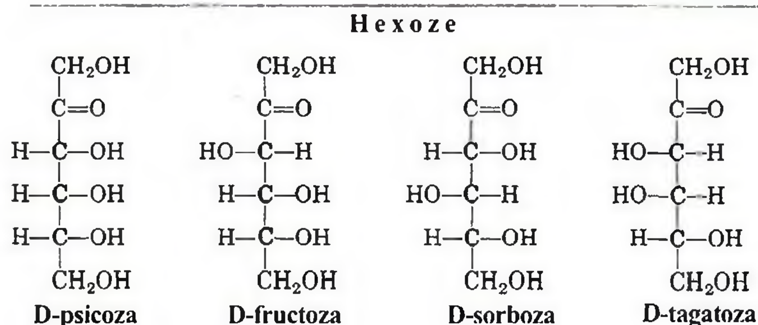
Dihidroxiacetona:
CH_2OH
C=O
CH_2OH

D-eritruloza:
CH_2OH
C=O
H–C–OH
CH_2OH

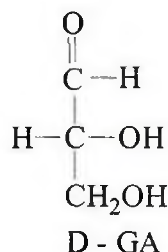
D-ribuloza:
CH_2OH
C=O
H–C–OH
H–C–OH
CH_2OH

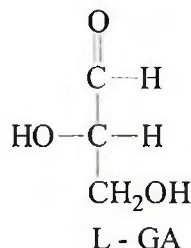
D-xiluloza:
CH_2OH
C=O
HO–C–H
H–C–OH
CH_2OH

H e x o z e



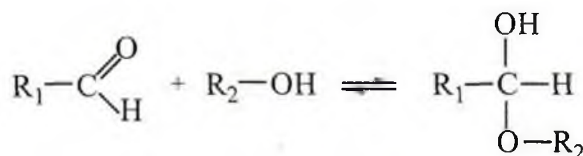
D-cetoze
(b)





Multe aldoze posedă cîțiva centri chiralici. Astfel, s-a stabilit că seriile D şi L vor confirma configurația atomului C maximum asimetric, deplasat de la atomul de carbon al grupei carbonilice, dar nu şi sensul de rotație + sau - al planului luminii polarizate de către zahărul respectiv.

Monozaharidele, scheletul cărora e compus din 5 şi mai mulți atomi de carbon, în soluție capătă forma de structuri ciclice închise, în care grupa carbonil formează o conexiune covalentă cu una din grupele hidroxil legată cu atomul de carbon al lanțului de bază:

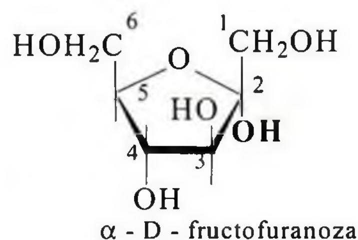


Gruparea hidroxil, aparută la fostul carbon carbonilic, este denumită hidroxil semiacetalică sau *glicozidică*. Structurile monozaharidelor, conținînd cicluri de 5 atomi, se numesc furanozice (prin analogie cu heterociclul *furan*), pe cînd cele de 6 atomi se numesc piranozice (heterociclul *piran*).

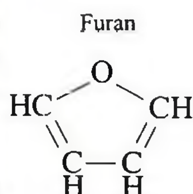
Pentru trecerea de la formulele liniare de proiecție la cele ciclice (de perspectivă) se aplică următoarea regulă: deasupra planului moleculei se indică grupele, ce se găsesc pe lîngă atomii de carbon în L-configurație (cu excepția C-5 în piranoze şi C-4 în furanoze); mai jos – atomii de C în D configurație. Pentru lanțul lateral, pe lîngă C-5 (piranoze) şi C-4 (furanoze), regula se inversează. Avantajul constă în faptul că ele (grupele) pot fi rotite în spațiu sub orice unghi, fără ca acestea să-şi piardă proprietățile.

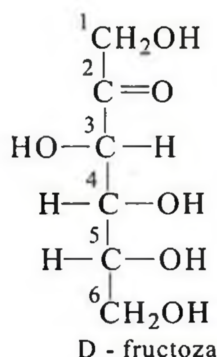
Ca urmare a reacțiilor de ciclizare, fostul carbon carbonilic devine *carbon asimetric*, adoptînd două configurații sterice diferite – α şi β anomer. Stereoizomerul care are aceeaşi configurație la C-1 ca şi ultimul atom asimetric ce determină seria monozaharidului (D sau L), este denumit *α-anomer*. Stereomerul de configurație contrară al acestor doi atomi e denumit *β-anomer*. Reacțiile de semiacetalizare sunt reversibile, forma liniară carbonică se află în echilibru cu diverse structuri ciclice posibile în soluțiile apoase. Cetohexozele formează, în majoritatea cazurilor, inelul furanozic în poziția β, cu legătura semiacetalică. Aldohexozele, însă, pot forma atare inel care e mai puțin constant decît cel piranozic.

Proprietățile chimice ale monozaharidelor sunt determinate atît de grupările funcționale caracteristice, cît şi de ansamblul catenei.

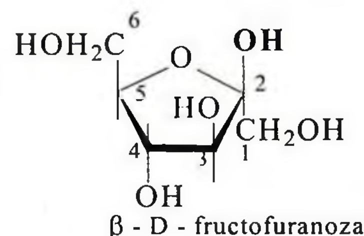


α - D - fructofuranoza

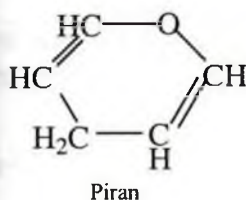


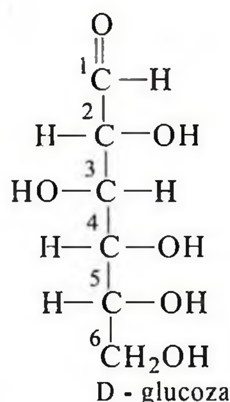


D - fructoza

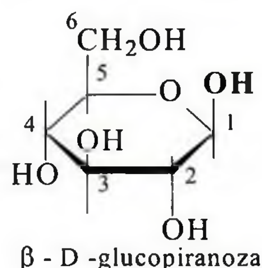


β - D - fructofuranoza

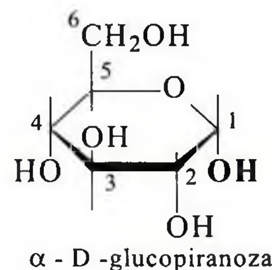




D - glucoza



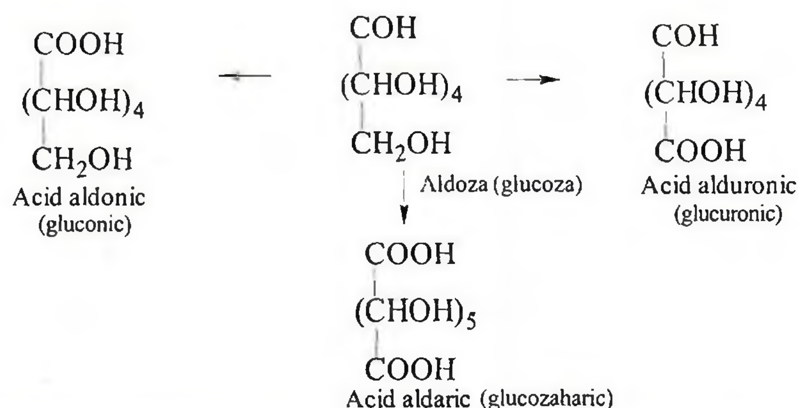
β - D -glucopiranoza



α - D -glucopiranoza

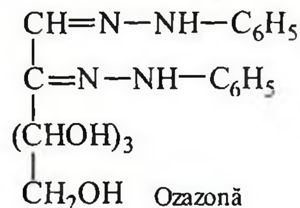
Proprietățile reducătoare se manifestă la introducerea lor în soluțiile unor săruri complexe de metale (cupru, argint, bismut), ai căror ioni sunt reduşi la valențe inferioare (Fehling, Benedict). La baza reacției se află ionii de Cu^{2+}, complexați de ionii tartrat (F) sau citrat (B), cu formarea oxidului cupros, – precipitat roşu. În reacțiile Tollens şi Nylander (Ag^{+} şi Bi^{3+}) are loc depunerea metalelor respective în forma de precipitat negru. În testele Fehling şi Benedict, monozaharidele suferă oxidări complexe, cu ruperea catenei de atomi de carbon, obținîndu-se diferiți produşi de reacție. Se produce o oxidare în mediu alcalin, ce decurge neuniform şi complicat.

În cazul oxidării într-un mediu acid, se obțin *acizi uronici* (oxidarea la gruparea alcool primar) sau *zaharici (aldarici)*:



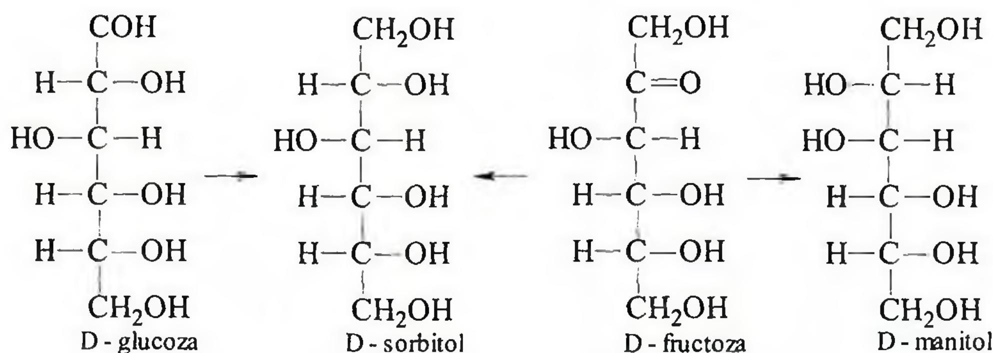
Sărurile acizilor gluconici sunt foarte solubile şi permit includerea în alimentaţie a unor elemente necesare ca fierul sau calciul. O formă utilizată de calciu în medicină este gluconatul de calciu, în care Ca^{++} previne hipocalcemiile şi apariţia tetaniilor, iar acidul gluconic serveşte ca substrat energetic.

La tratarea monozaharidelor cu acizi minerali concentraţi (HCl, H_2SO_4) şi cuplarea imediată cu diverşi fenoli (reacţia Selivanoff cu rezorcină), fructoza pierde trei molecule de apă, transformîndu-se în *oximetilfurfurol* care, împreună cu rezorcina, formează un compus roşu-vişiniu.

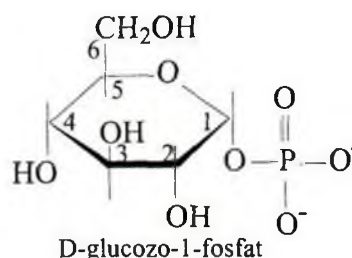


Condensarea unor monozaharide cu fenilhidrazina (C_6H_5-NH-NH_2) formează *ozazone*, substanţe galbene, cristalizate. Monozaharidele identice după C_1 şi C_2 reprezintă cristale identice (glucoză, fructoză). Galactoza formează o ozazonă distinctă de glucoză.

Condensarea cu compuşi ce conţin grupările amino ale unor proteine este responsabilă de formarea în organism a proteinelor glicozilate (hemoglobina, unele proteine la diabet zaharat).

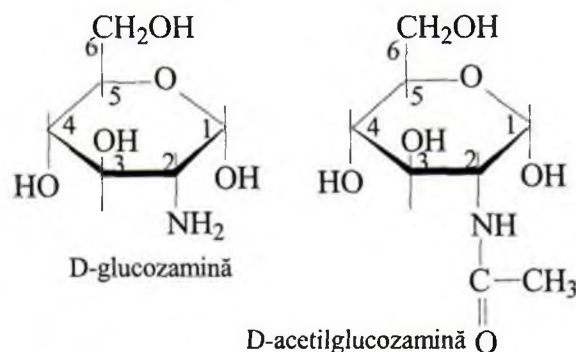


Reducerea monozaharidelor generează polioli. În organism reacțiile sunt catalizate de enzime NAD-dependente. Glucoza și fructoza se reduc la *D-sorbitol, galactoza - galactitol.*



D-glucozo-1-fosfat

Un important poliol este și *ribitolul*, derivat al ribozei, un component al vit. B_2. Compuși răspîndiți în regnul vegetal sunt sorbitolul, manitolul și galactitolul. În organizmele vii este prezent inozitolul atît în stare liberă, cît și fosforilată sau ca un component al fosfolipidelor, esterul hexafosforic al său (acidul fitic) fiind prezent în plante și servind drept o sursă veritabilă de fosfat. Sărurile sale de calciu și magneziu se numesc *fitină*.

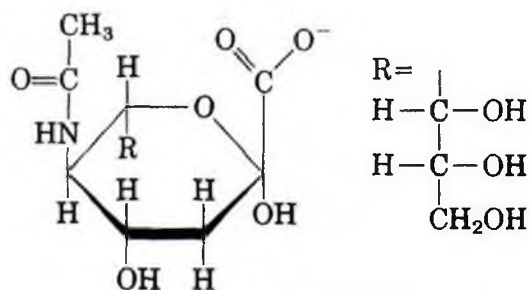


D-glucozamină

D-acetilglucozamină

O etapă importantă în menținerea ozelor în celulă și în metabolizarea lor este procesul de esterificare cu acid fosforic.

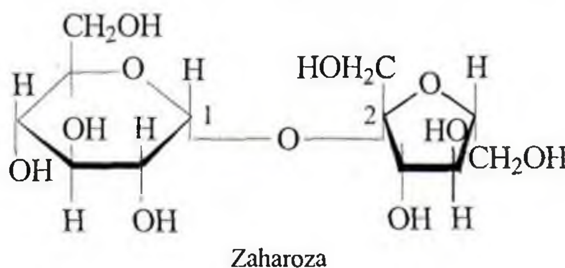
La interacțiunea grupărilor semiacetalice, ce formează glicozidele. În soluție, există numai o singură formă ireversibilă (α sau β). Gruparea semiacetalică se blochează. Derivați de natură glicozidică sunt *oligozaharidele* și *polizaharidele*. Reacția cu o componentă neglucidică (aglicon) conduce la O-, S-, N- glucozide. Ultimele, componenta monozaharidică a cărora constituind-o D-ribo- sau D-dezoxiribofuranoza și agliconul – bază azotată, sunt nucleozidele. Mucopolizaharidele conțin *glucozamina* și *galactozamina*, *N-acetil glucozamina*. Glucozamina se află în antibioticul *streptomicina* (în forma N-metilată). O aminoglucidă mai complexă, formată dintr-un rest de acid piruvic și alte resturi de monozoamină este *acidul neuraminic* – o componentă esențială a glicolipidelor și glicoproteinelor. În glicozidele cardiotonice, drept aglicon servește compusul steroidic.



Acidul N-acetilneuraminic (acid sialic)

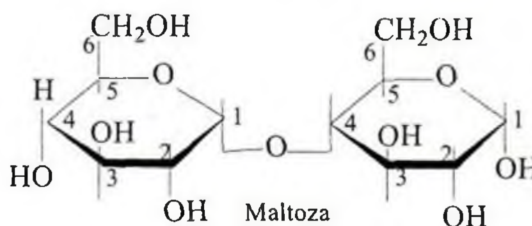
OLIGOZAHARIDELE

Oligozaharidele reprezintă compuşi glucidici obţinuţi prin condensarea a două sau a mai multor monozaharide (maximum 10). Mai importante sunt *dizaharidele*. Prin condensarea a două molecule de monozaharidă rezultă *dizaharide reducătoare* (ele păstrează un hidroxil semiacetalic – maltoza, lactoza) şi *nereducătoare* (participă ambii hidroxili semiacetalici - ***zaharoza***: α-glucopiranozid – β-fructofuranozid, glucid foarte răspîndit în regnul vegetal, mai ales în trestia de zahăr şi sfeclă, cu o valoare nutritivă deosebită). Zaharoza n-are anomer liber al carbonului şi nu posedă proprietăţi reducătoare. Este un produs intermediar în fotosinteza plantelor şi o formă de transport al glucidelor.



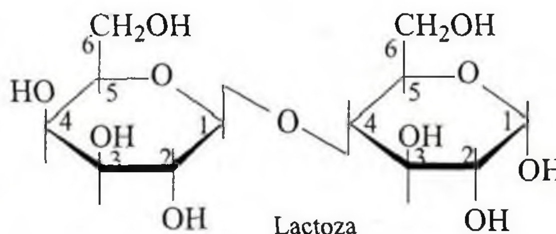
Zaharoza

Maltoza (α-glucopiranozid – 4-glucopiranoza), glucid reducător, rezultă la hidroliza enzimatică a amidonului şi glicogenului.



Maltoza

Lactoza (β-galactopiranozid – 4-glucopiranoza) este un glucid reducător, sintetizat din glucoză, se conţine în laptele mamiferelor.



Lactoza

POLIZAHARIDELE

Glicanii (homo- şi hetero-) sunt compuşi glucidici care formează, prin hidroliză, monozaharide sau derivaţi ai acestora.

Homozide. *Amidonul* prezintă un poliglucid deosebit de răspîndit în regnul vegetal. Se formează în plantele verzi, în procesul de fotosinteză. În continuare, este scindat hidrolitic pînă la glucoză, vehiculat în diverse ţesuturi, resintezat şi depozitat sub formă de granule. Se conţine în seminţe de grîu – 63-67%, orez – 70-80%, porumb – 60-66%, fasole – 40-43%. În starea pură, amidonul se prezintă ca o pulbere albă, granulară, hidroscopică. Este insolubil în apă rece, iar in apă caldă formează soluţie coloidală.

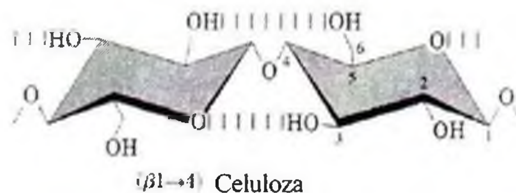
Structural, amidonul este constituit din resturi de α-D- glucopiranoză legate 1-4 şi 1-6. Cota *amilozei* este de 20-30% din totalul amidonului, iar circă 70-80% îi revine *amilopectinei*. În ultima structură apar legături 1-6%, fapt care conferă macromoleculei o structură ramificată. Amiloza cu iodul dă o coloraţie albastră intensă, iar amilopectina – roşie-violetă.

Celuloza, ca şi amidonul, este un homopolizaharid ce conţine mai mult de 10000 resturi de D-glucoză racordate prin legături glicozidice 1,4. Glucoza în celuloză repre-

zintă configurația β. O particularitate neînsemnată în structura ei implică consecințe esențiale pentru proprietățile glucidului. Avînd o configurație β, lanțurile de celuloză sunt foarte întinse, formînd o structură liniară, neramificată, fibre insolubile.

Celuloza – polizaharid predominant în regnul vegetal, este cel mai răspîndit în biosferă, constituind componentul primordial al pereților celulari ai plantelor. *Celobioza* este unitatea structurală a celulozei, reprezentînd un dizaharid format din două molecule de β-glucoză. *Celobiaza* scindează enzimatic celobioza.

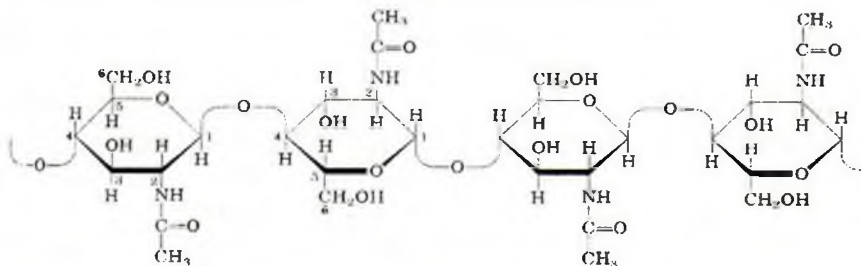
Celuloza este hidrolizată de o enzimă specifică – *celulaza*, sintetizată de unele bacterii și ciuperci, fiind constituentul sucului intestinal al animalelor inferioare. La animalele rumegătoare, numeroasele bacterii ce parazitează în tubul digestiv sintetizează și elimină enzima ce scindează celuloza la D-glucoză, fermentînd-o pînă la acizii grași, cu o catenă scurtă, CO_2, metan (CH_4), ultimul fiind eliminat prin recurgitați. Microorganismele, ulterior, sunt scindate de enzimele intestinale. *O simbioză dintre microorganisme și vacă,* unde primele au posibilitate să se *bucure de o viață scurtă,* dar fericită, într-un mediu cald, plăcut. În stare pură, celuloza este o substanța amorfă de culoare albă, fără gust și miros. Nu se dizolvă în apă sau în alte soluții (cu excepția reactivului Schweitzer - hidroxidtetraamoniacocupric - $[Cu(NH_3)_4](OH)_2$). Acizii minerali tari o precipită, iar în prezența NaOH (2N) fibrele de celuloză suferă o imbibare limitată – fenomen ce stă la baza procedeului tehnologic denumit *mercerizare.*



(β1→4) Celuloza

La om, celuloza este necesară penru mărirea peristaltismului intestinal. Organismul uman nu dispune de enzima capabilă să scindeze legătura β-glicozidică și, deci, ea nu poate fi utilizată ca sursă de energie.

Chitina – polimer de glucozamină, cu o cantitate echimoleculară de acid acetic, se unește în lanțuri lungi prin legături de tip 1,4-β-glucozidic. Se conține în carapacea crustaceelor și a insectelor, e rezistentă la acizi și alcali, e insolubilă în majoritatea solvenților. Carcasa este consolidată de carbonatul de calciu.

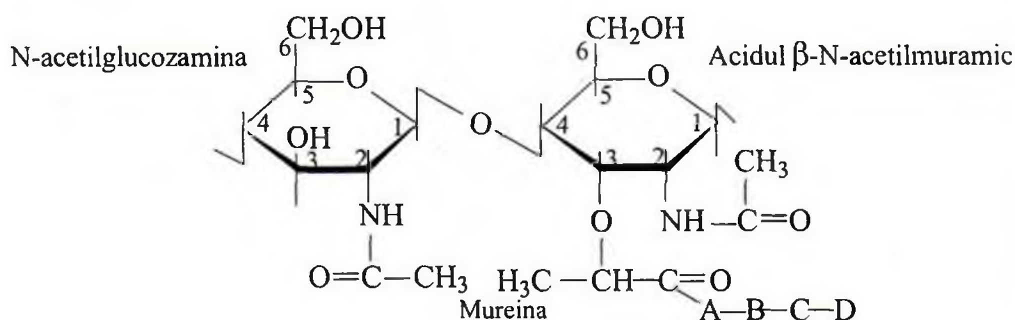


Segment de chitină – homopolimer compus din N-acetil-D-glucozamină β1,4

O mucopolizaharidă omogenă este și *acidul sialic*, constituit din resturi de acid neuraminic – N-acetilat legat prin legături 2-4. Este constituent al glicoproteinelor membranare și protejează celulele de atacul enzimatic și al toxinelor chimice. Neuraminidaza virotică scindează acidul sialic și facilitează pătrunderea virușilor în organism.

Citozolul celulelor bacteriene e protejat de peretele celular. Această carcasă este transversată de legături covalente formate de lanțuri polizaharidice compuse din N-acetil-D-glucozamin şi N-acetilmuramic, acizi, racordați prin legături β 1,4.

Lanțul lateral peptidic (A,B,C,D) variază de la specie la specie. Structura fortificată de legături covalente transversale ce contureazã celula e denumită ***mureină*** sau peptidoglican.



Antibioticele (penicilina) inhibă sporirea numărului de bacterii şi frînează ultima etapă de sinteză fermentativă a peptidoglicanilor la microorganismele sensibile. În salivă se întîlnesc şi polizaharide extracelulare de origine bacteriană: *dextranii*, – polimeri ai glucozei (α- 1-6; β - 1-3 şi 1-2), şi *levanii*, – polimeri ai fructozei (1-2). Aceşti polimeri sunt adevărați lianți ai plăcii dentare, se formează pe contul zaharozei considerată, din acest motiv, cea mai cariogenă.

Heterozide. Componenta glucidică se leagă cu atomul de oxigen, sulf sau azot al agliconului prin hidroxilul semiacetalic. Sunt răspîndite heterozidele îndeosebi în regnul vegetal şi au fost izolate din diverse organe ale plantelor. La animale s-au decelat în unele țesuturi şi umori. În funcție de natura agliconului se disting:

1.O-heterozide – rezultante prin condensare cu un hidroxil alcoolic, fenolic, sterolic sau heterociclic;

2. S-heterozide – formate prin condensare cu tioli;

3. N-heterozide – generate prin condensare cu grupări aminice ale unor compuşi organici.

Aproape toate glicozidele naturale sunt β -glicozide, dar pot exista sub ambele forme.

Preponderent, componenta glucidică este D-glucopiranoza şi nu posedă proprietăți reducătoare. *Glicozidazele*, enzimele hidrolitice hidrolizează aceşti compuşi dar sunt prezente în alte celule unde glicozidele nu sunt constituenți fiziologici.

O-heterozide. Sunt glicozide în care agliconul este un compus cianhidric, din care face parte şi *amigdalina*. Ea prezintă un diglucid – *gențiobioza* şi un aglicon – ***nitrilul acidului mandelic***. În natură, amigdalina se află în migdale amare, în sîmburi de piersici, caise, prune. La hidroliză formează 2 molecule de β – D-glucoză, una de aldehidă benzoică şi una de acid cianhidric:

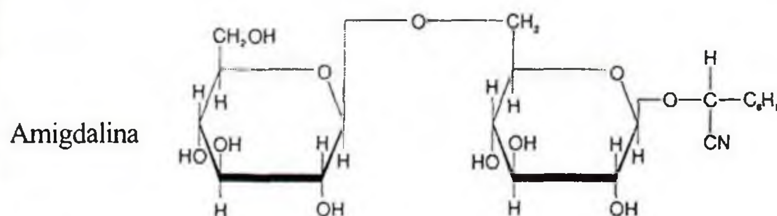


$$C_{20}H_{27}NO_{11} + 2H_2 \longrightarrow 2C_6H_{12}O_6 + C_6H_5CHO + HCN$$

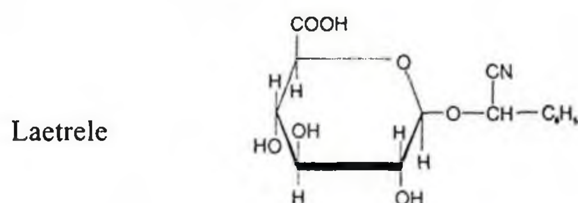
Enzimele florei intestinale sunt capabile să hidrolizeze amigdalina, cu eliberarea acidului cianhidric. Absorbția lui generează efectul toxic.

Amigdalina și *laetrele* se consideră ca agenți antitumorali – tumorile posedînd activitate β-glucuronidazică sau β-glucozidazică eliberează HCN – cauza morții celulare.

Amigdalina



Laetrele



Din această grupă de heterozide fac parte și glicozidele cardiotonice – digitaloidele, strofantozidele.

S-heterozide. Sunt compuși care la hidroliză eliberează oze și *senevoli.* Ultimii sunt esteri ai acidului izotiocianic – R – N = C = S. Atare compuși se află în semințele unor plante din familia crucifere, liliacee, leguminoase etc.

Sunt desemnate și 2 clase de compuși chimici în componența cărora intră o fracțiune glucidică și o fracțiune protidică (glicoproteide) sau lipidică (glicolipide). Legăturile sunt covalente, iar cuantumurile compușilor sunt foarte diferite. Fracțiunea glucidică este reprezentată printr-un lanț scurt denumit *glican* (proteoglicanii). La această clasă de glicoproteine se referă hormonii hipofizari, glicoproteinele sanguine, haptoglobulinele etc.

Glicolipidele – decelate în creier, în țesutul nervos și iau parte în neurotransmitere la nivelul receptorilor, sunt implicate în recunoașterea celulară, în imunitatea tisulară etc.

DIGESTIA ŞI ABSORBŢIA GLUCIDELOR

Glucidele stau la baza existenţei majorităţii organismelor. Ele ne parvin prin alimentare sub formă de polizaharide (*amidon, glicogen*), dizaharide (zaharoză, maltoză, lactoză), monozaharide (glucoză, fructoză, galactoză, pentoză). Procentajul lor variază în dependenţă de vîrstă. În procesul digestiei sunt hidrolizate pînă la monozaharide – singura formă absorbabilă. Cota amidonului e de 50% din glucidele utilizate de om. Componentele amidonului sunt rapid hidrolizate de *α-amilază* de natură salivară şi continuă sub acţiunea amilazei pancreatice. Enzima hidrolizează legăturile interne α-1,4, formînd *maltoză, maltotrioză* şi *α-dextrine*. Ultimele sunt alcătuite din cîteva resturi de glucoză legate 1,6 suplimentar la cele 1,4. Maltoza şi maltotriozele sunt hidrolizate pînă la glucoză de *maltază*, pe cînd α-dextrinele sunt hidrolizate de *α-dextrinază* (α-1,6-glucozidază).

Dextrinele sunt substanţe lipicioase, constituind materia primă de bază a cleiului. Cartoful la fierbere elimină *amiloza* ce conferă culoare apei. Din conţinutul de amidon al cartofului rămîn 80% de *amilopectină*.

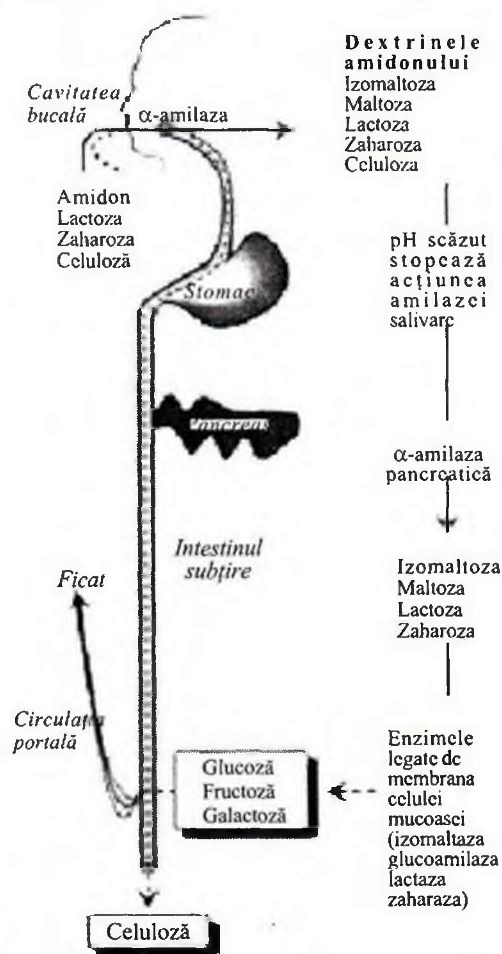


Figura 4.1. ***Digestia glucidelor***

Dizaharidele sunt hidrolizate de dizaharidaze, reprezentate de enzime specifice: *lactază* (β-galactozidază), *maltază* (α-glucozidază), *zaharază* (α-glucozidaza sau β-fructozidază). Enzimele sunt sintetizate de către enterocite.

Substratul morfologic al digestiei şi absorbţiei intestinale este constituit din membrana enterocitelor, care se profilează luminal în formă de perie şi de textură de mucopolizaharide, ce căptuşesc suprafaţa luminală (*glicocalix*). Hidrolazele nu sunt eliminate în cavitatea intestinală. Ele se concentrează şi acţionează pe marginea periei celulelor, iar monozaharidele sunt eliberate în vecinătatea imediată a sistemelor de transport (fig.4.1)

Pentru absorbţie sunt necesari ionii de Na^+, care formează cu monozaharidele compuşi ce sunt transportaţi în celule. Na^+ activează ATP-aza ce amplifică scindarea ATP şi eliberarea energiei necesare pentru absorbţie. Na^+ eliberat este retransferat. Procesul activ constă în fosforilarea monozaharidei (există investigaţii experimentale care confirmă sporirea fosforului organic şi reducerea celui neorganic, precum şi micşorarea glucozei).

Inhibitorii fosforilării oxidative blochează absorbția monozaharidelor. Acidul fosforic este pus în libertate de o fosfatază. Procesul de fosforilare a monozaharidelor este stimulat de vitaminele B_1 și C, metionină și hormonii suprarenali (sistem simport glucoză - sodiu).

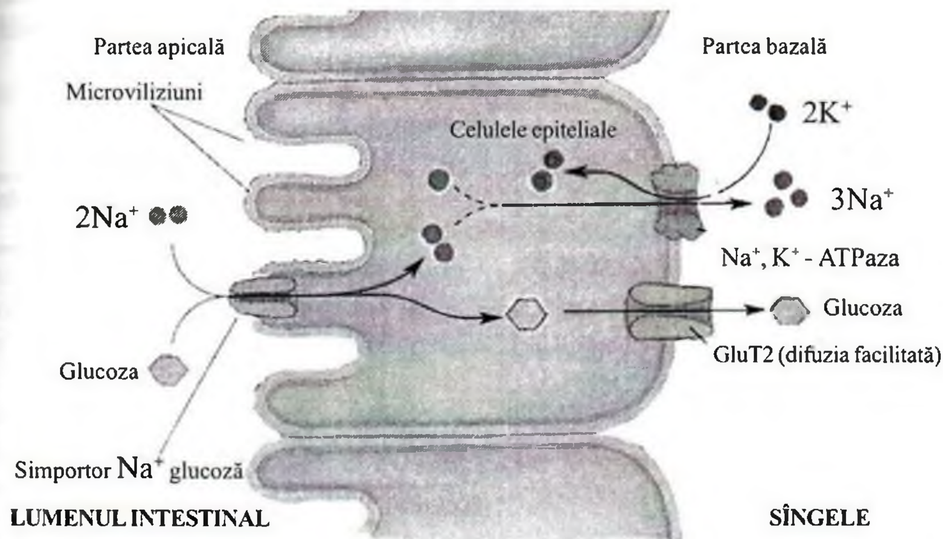


Figura 4.2. ***Trasportul glucozei în celulele epiteliale intestinale***

Se consideră că transportatorul leagă în locuri separate atît glucoza, cît și Na^+. Na^+ mărește afinitatea transportatorului monozaharidelor.Glucoza iese ușor din celulă prin difuzie facilitată, iar Na^+ este expulzat contra gradientului de concentrație prin intervenția enzimei ATP-azei Na^+, K^+ dependentă (fig.4.2). Această enzimă menține gradientul de concentrație a Na^+ și, deci, reîncărcarea transportului cu glucoză. *Anabaina* inhibă pompa de sodiu și, simultan, transportul glucozei. Schema structurală și modelul conformațional al enzimei Na^+, K^+ - ATPazei sunt redate în fig 4.2.a.

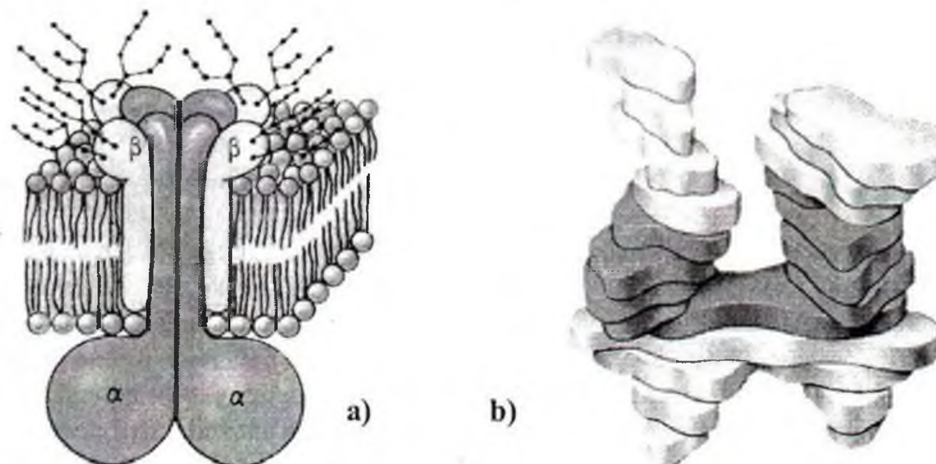


Figura 4.2a. ***Enzima Na^+, K^+ - ATP-aza***
a) schema structurală în care α și β sunt subunități polipeptidice;b) modelul conformațional

O altă sursă de glucoză e *glicogenul* – forma rezervă a glucozei, uşor mobilă. Glicogenul reprezintă un polimer foarte ramificat, compus din resturi de glucoză, unite în cea mai mare parte prin α-1,4 legături glucozidice. Ramificarea se datorează legăturii α-1,6. La fiecare 10 resturi revine o legătură α-1,6. Glicogenul se depozitează în cantităţi majore în ficat, revenindu-i pînă la 7% din cota totală. Degradarea glicogenului şi digestia glucidelor poate fi analizată în fig.4.1 şi 4.3.

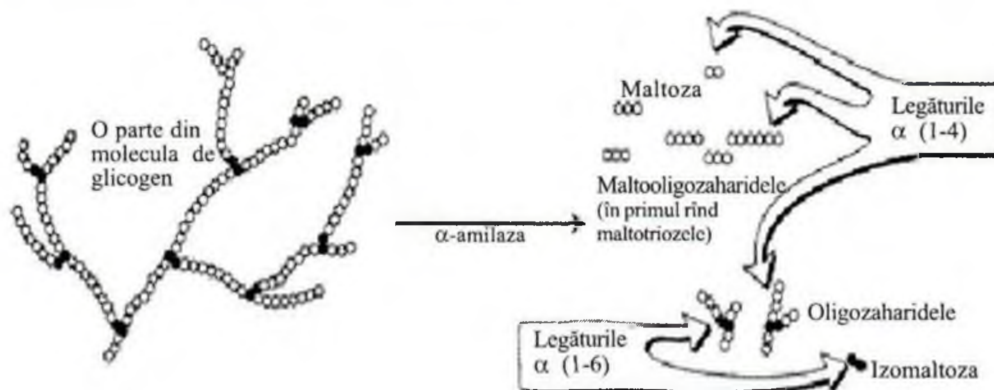


Figura 4.3. ***Degradarea glicogenului de α-amilază (salivară şi pancreatică)***

Energia dependentă de conţinutul glucozei din umorile organismului atinge circa 40 kcal. Pentru glicogen valoarea numerică e de 600 kcal. Glicogenul se conţine în citozol sub formă de granule cu diametrul da la 100-400 Å, fiind dependent de mărimea moleculelor.

Transferul intracelular al glucozei

Glucoza străbate membrana celulară cu ajutorul unor *transportatori pasivi*. Aceştia permit circulaţia glucozei în ambele sensuri, deoarece funcţionarea lor nu necesită consum de energie. Transportatorii glucozei, denumiţi genetic GluT, constituie o familie de glicoproteine transmembranare, codificate de gene diferite. Fixarea glucozei pe faţa extracelulară a membranei antrenează o modificare conformaţională a proteinei transportatoare, care determină trecerea glucozei pe partea cealaltă a membranei şi eliberarea ei în interiorul celulei.

Există mai multe tipuri de transportatori GluT, a căror exprimare genetică este dependentă de tipul de ţesut şi care diferă între ei prin afinitatea pentru glucoză, exprimată prin Km:

a) transportatorii GluT 1 sunt preponderenţi la nivelul eritrocitelor, placentei; Km este de aproximativ 1 mM, concentraţie mult inferioară celei de glicemie, ceea ce favorizează intrarea glucozei în celule, chiar în condiţii de hipoglicemie, în perioadele dintre mese;

b) transportatorii GluT 2 sunt preponderenţi în ficat şi pancreas; Km se cuprinde între 15-20 mM, concentraţie mult superioară celei de glicemie postprandială, ceea ce determină intrarea rapidă a glucozei provenite din absorbţia intestinală în hepatocite, în condiţii de hiperglicemie; în caz contrar, în situaţii de hipoglicemie pătrunderea glucozei în hepatocite este minimă;

c) transportatorii GluT 3 sunt preponderenți la nivelul encefalului, placentei şi au aceleaşi caracteristici ca şi GluT1;

d) transportatorii GluT 4 sunt preponderenți la nivelul țesutului adipos şi muscular; Km este de aproximativ 5 mM, valoare apropiată de cea a glicemiei; sinteza şi afinitatea lor pentru glucoză este reglată de către insulină;

e) transportatorii GluT 5 sunt prezenți în special la nivelul epiteliului intestinal, unde intervin şi în transportul fructozei.

Reglarea exprimării şi afinității transportatorilor pentru glucoză

Reglarea este asigurată de insulină. Sensibilitatea la insulină este variabilă în dependență de țesuturi:

- *în ficat* transportatorii GluT 2 sunt numeroşi şi aparent independenți față de concentrația insulinei plasmatice; randamentul funcționării lor este ridicat, astfel încît concentrațiile extracelulare şi intracelulare ale glucozei se echilibrează aproape instantaneu; intrarea glucozei în hepatocite nu este deci etapa limitată de viteza metabolismului său.

- în *țesutul adipos şi muscular* transportatorii GluT 4 sunt dependenți de *insulină*, care stimulează sinteza şi afinitatea lor pentru glucoză, acesta fiind unul din cele mai importante mecanisme de reglare a metabolismului glucidic, deoarece transportul intracelular al glucozei constituie *etapa limitată de viteză* a metabolizării sale în aceste țesuturi.

Patologiile medicale

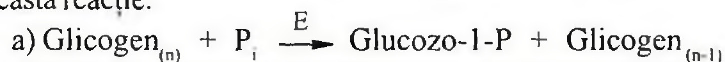
Deficiențele dizaharidazelor localizate la nivelul marginii de perie a enterocitelor cauzează *malabsorbția glucidelor*. Cel mai frecvent este *deficitul ereditar al lactazei*, care provoacă intoleranță la lactoză, manifestată la nou-născuți prin diaree în urma ingestiei de lapte.

Malabsorbția congenitală a glucozei şi galactozei se manifestă prin diaree severă în perioada neonatală, care poate cauza moartea prin dehidratare. Afecțiunea este cauzată de deficitul cotransportatorului glucoză-Na^+ şi impune suprimarea glucidelor din alimentație, cu excepția fructozei şi a inulinei (polimer de β- fructoză 1-2).

Insulinorezistența periferică a fost evidențiată la nivelul celulelor musculare, unde transportatorii GluT 4 răspund deficitar la secreția de insulină. Ca urmare, membranele celulare devin relativ impermeabile pentru glucoză, a cărei degradare intracelulară este mult mai diminuată. Această anomalie determină hipersecreția de insulină la nivelul insulinorezistenței periferice. Acest *sindrom biochimic* a fost descoperit la pacienții cu *diabet zaharat*, *obezitate* sau diverse *afecțiuni metabolice ereditare*.

Glicogenoliza

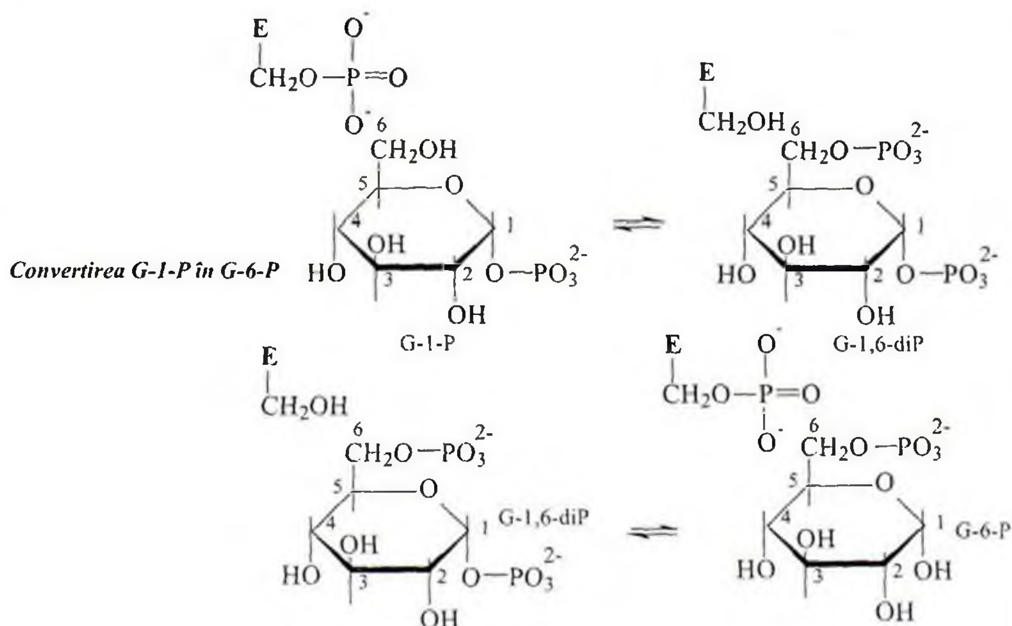
A fost studiată de Carl şi Gerty Cori. S-a demonstrat că glicogenul e scindat de ortofosfat, formînd un tip nou de zahăr, identificat glucozo-1-fosfat (ester Cori). Aceşti savanţi au căpătat şi au cristalizat enzima *glicogen fosforilaza (GF)*, ce catalizează această reacţie.



a) $Glicogen_{(n)} + P_i \xrightarrow{E} Glucozo\text{-}1\text{-}P + Glicogen_{(n-1)}$

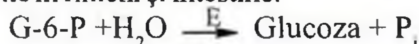
Ortofosfatul scindează legătura glicozidică dintre atomul de carbon C-1 al restului terminal şi C-4 al restului învecinat. Ruperea legăturii este specifică menţinîndu-se α-conformaţie la C-1. *In vivo* reacţia este deplasată în direcţia scindării glicogenului, cauzată de raportul P/G-1-P ⟶ 100. Scindarea fosforilitică e economă, zahărul eliberat e fosforilat. În continuare, glucoza fosforilată nu difundează din celulă în raport cu glucoza liberă. Sub acţiunea glicogen fosforilazei glicogenul se scindează într-un grad mic. Legăturile α-1,6 în punctele de ramificare nu sunt sensibile la G-F (glicogen-fosforilază). Efectul ei se stopează la restul terminal situat de la ramificare cu 4 resturi de glucoză. E necesară o nouă enzimă. O *transferază* transferă blocul din trei resturi de glucoză de pe o ramură externă pe alta. Enzima hidrolitică e atestată ca *enzimă de deramifiere (debranching enzima)*. Mai departe, fosforilaza îşi continuă nestingherită acţiunea pînă în apropierea unui nou punct de ramificare. Ca urmare a acţiunii acestor enzime, se obţin G-1-P şi mici cantităţi de glucoză.

b) G-1-P este convertit la G-6-P sub acţiunea fosfogluco mutazei. În centrul activ al enzimei e prezentă o serină fosforilată. În cadrul catalizei grupa fosforil posibil e transferată la OH al C_6 din G-1-P cu formarea G-1,6-diP, după care grupa fosforil a acestui produs intermediar este transferată pe restul Ser în centrul activ şi în final se formează G-6-P, regenerînd enzima fosforilată. Amestecul rezultant conţine 95% G-6-fosfat. Enzima necesită, drept cofactor, ionul de Mg^{2+};



Convertirea G-1-P în G-6-P

c) în ficat G-6-P (ester Robinson) este hidrolizat sub acțiunea enzimei *glucozo-6-fosfatază*. Enzima se conține în rinichi și intestine.



$$G\text{-}6\text{-}P + H_2O \xrightarrow{E} Glucoza + P_i$$

Ficatul menține glucoza în sînge la un nivel relativ constant. El eliberează glucoza în timpul activității intensive (efort fizic) sau în intervalul dintre alimentări. Glucoza eliberată e utilizată în primul rînd de mușchi și creier (fig. 4.4). Glicogenoliza nu necesită aport energetic suplimentar.

Legătura α-1,6

Capătul reducător

H_2O

Glucoză

α-glucozidaza lizozomală

Capetele nereducătoare

Tip II: Boala Pompe
(deficit de α-1,4 -glucozidază lizozomală)
- defect înnăscut de enzima lizozomală;
- generalizat (ficat, inimă, mușchi);
- concentrații excesive de glicogen în vacuole anormale din citozol;
- valori normale ale zahărului sanguin;
- cardiomegalie severă, de regulă, cu moarte timpurie;
- structura glicogenului este normală.

Tip V: Sindromul McArdle
(deficiența glicogen fosforilazei din mușchii scheletici)
- mușchiul scheletal este afectat, enzima hepatică este normală;
- slăbiciune temporară și crampe ale mușchilor scheletali după efort;
- lactatul nu crește în sînge în timpul unui efort mare;
- dezvoltare mentală normală;
- mioglobinurie la vîrstă înaintată;
- pronostic bun;
- în mușchi nivel crescut de glicogen cu structură normală;

Pi

Glicogen fosforilaza

1

Glucozo-1-P

Dextrine limite

Debrancing enzimă

Glicozil transferaza

2

3

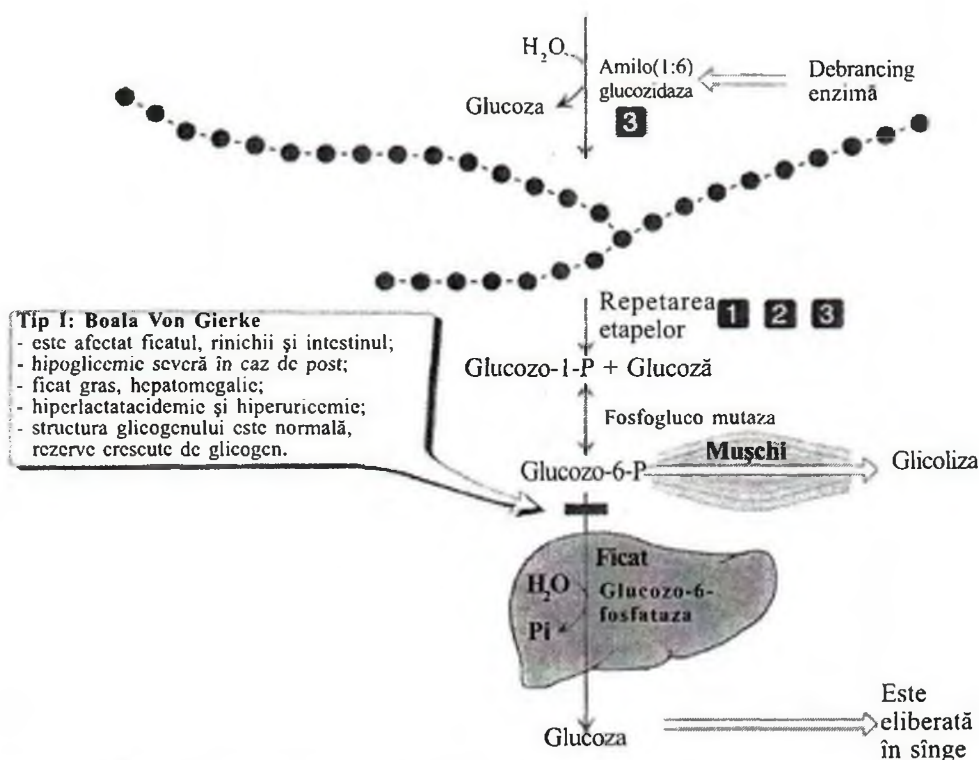


Figura 4.4. ***Schematic e redată degradarea glicogenului cu dereglările respective***

În afară de maladiile menţionate, sunt cunoscute şi alte glicogenoze ca:

a) *afecţiunea Cori* defectă e enzima α-1,6 glucozidaza (enzima de deramifiere), este implicat în proces ficatul, inima, muşchii scheletali (*maladia Forbes*);

b) *maladia Anderson* este cauzată de deficienţa enzimei de ramifiere (α-1,4-1,6 transglucozidaza), este afectat ficatul, splina, intestinul, unde se acumulează glicogen cu catene neramificate. Progresează ciroza ficatului şi evoluţia este fatală pînă la vîrsta de 20 ani;

c) *glicogenoza Hers* se caracterizează prin diminuarea activităţii fosforilazei hepatice, avînd în consecinţă depuneri masive de glicogen normal în ficat. Manifestările clinice sunt asemănătoare unei forme atenuate a *maladiei Von Gierke*;

d) *insuficienţa fosfofructo kinazei* cauzează *maladia Tarui* – sunt afectaţi muşchii scheletali, eritrocitele ce determină o hemoliză intensă, acumularea lactatului. Diagnosticul şi tratamentul este mult mai complicat la asocierea a mai multor tipuri de glicogenoze;

e) deficitul de *glicogen sintetază* provoacă o hipoglicemie, cu accentuarea cetogenezei şi se caracterizează prin retard de creştere, deces precoce;

f) sunt descrise şi *glicogenoze de tip IX şi X*, cu deficit respectiv de *fosforilaz kinază* şi *proteinkinază* ce conduc la hipoglicemie şi hepatomegalie.

Majoritate glicogenozelor sunt afecţiuni ereditare ce duc la acumularea glicogenului în ţesuturi şi afectarea metabolismului glucidic, cu generarea simptomelor clinice ca: hepatomegalie, hipoglicemie, hipotonie musculară, deficit energetic în caz de efort fizic.

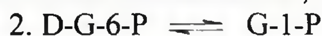
GLICOGENOGENEZA

Practic, are loc în orice țesut, procesul fiind deosebit de activ în ficat și mușchii scheletali.



1. α-glucoza + ATP $\longrightarrow$ D-G-6-P + ADP

Reacția este catalizată de *hexokinază*, ce necesită ioni de Mg^{+}.



2. D-G-6-P $\rightleftharpoons$ G-1-P

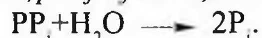
Reacția e catalizată de enzima *fosfogluco-mutaza.*



3. G-1-P + UTP $\longrightarrow$ Glucoză-UDP + PP_i

Reacția-cheie a sintezei glicogenului e activarea glucozei catalizată de enzima-G-1-P *uridil-transferază*.

O altă enzimă, *pirofosfataza*, hidrolizează PP_i la $2P_i$:



$PP_i + H_2O \longrightarrow 2P_i$.

4. Transferul grupelor glucozil de la UDP pe capătul nereducător al moleculei ramificate de glicogen e catalizat de *glicogen sintază* (GS):



UDP -G + $Glicogen_n$ $\longrightarrow$ UDP + $Glicogen_{n+1}$

În procesul acestei reacții se formează o legătură α-1,4 între C-1 al restului de glucoză și al C-4 restului terminal glucozid din lanțul glicogenului.

Echilibrul e deplasat în dreapta spre sinteza glicogenului. Enzima, ca activator, necesită ramura (inițiator, primer) moleculei de glicogen, cu nu mai puțin de 4 resturi de glucoză, la care enzima, consecutiv, adiționează grupe glucozidice din capătul nereducător. Rolul UDP-glucozei a fost evidențiat de biochimistul argentinian Luis Leloir, decernîndu-i-se Premiul Nobel în 1970.

Ramificarea se realizează sub acțiunea *4-6 transglucozidazei (enzima de ramifiere)* și implică transferul fragmentului oligozaharidic, cel puțin 6, la capătul nereducător al ramurii ce conține nu mai puțin de 11 resturi de glucoză pe OH al C_6 al glucozei din aceeași ramură sau alta, dar orientată spre interiorul moleculei. Ca rezultat, se formează o ramură nouă. Glicogen sintaza poate atașa la ea resturi de glucoză. În situația în care nu există un primer glicogenic se recurge la un primer de natură proteică – *glicogenina.* Ultima prezintă o proteină catalitică glucozil transferazică, care permite inițierea procesului de sinteză și adăugarea succesivă a cîtorva resturi glucozil. Procesul presupune transferul unui rest glucozil din UDP-glucoză pe gruparea OH a tirozinei din molecula glicogeninei. Sinteza glicogenului necesită un aport energetic echivalent cu 2 molecule de ATP.

Ramifierea amplifică solubilitatea glicogenului și numărul de capete nereducătoare (fig. 4.5).

Reglarea proceselor de liză și sinteză a glicogenului

Așadar, glicogenul se supune mai lesne acțiunii *glicogen fosforilazei* și *glicogen sintazei.*

Enzimele respective se reglează reciproc atunci cînd una e activă, cealaltă e inhibată. Glicogen fosforilaza și glicogen sintaza sunt prezente în două forme: fosforilate și defosforilate. Controlul metabolic variat și complex este realizat atît prin reglarea covalentă, cît și prin cea alosterică. S-a stabilit că: G-Fa e activă în forma fosforilată și G-Fb e mai puțin activă defosforilată, pe cînd G-Sa e activă în forma defosforilată și G-Sb mai puțin activă – fosforilată.

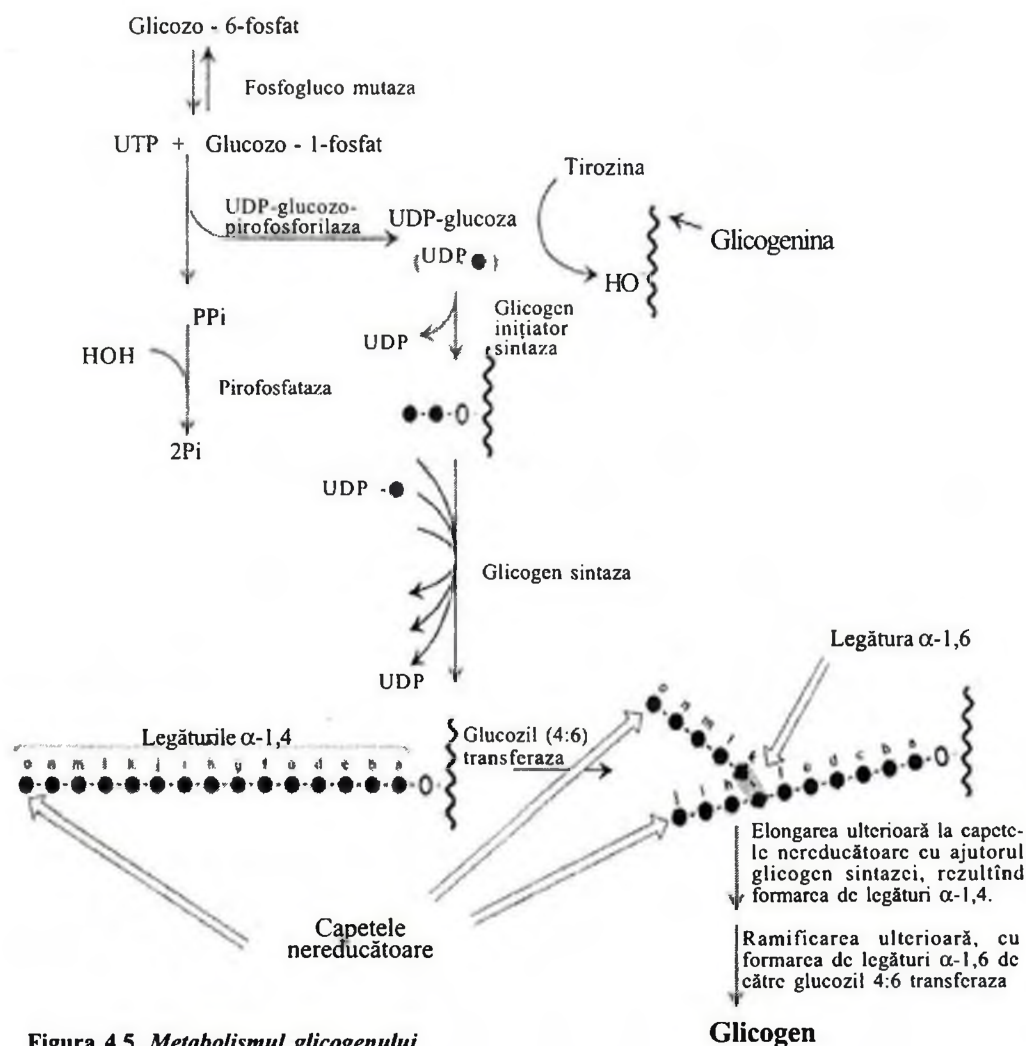


Figura 4.5. ***Metabolismul glicogenului***

Interconversia celor două forme ale G-F se realizează grație acțiunii antagoniste a două enzime: *glicogenfosforilaz kinaza* și *glicogenfosforilaz fosfataza*. Kinaza fosforilează restul de serină în centrul activ al G-Fb, cu ajutorul ATP. Fosfataza scindează hidrolitic P de la G-Fa.

Glicogen fosforilaz kinaza (G-F-K) reprezintă o enzimă constituită din 4 tipuri de subunități, fiecărei fiindu-i proprii 4 copii. Subunitatea γ – subunitate catalitică; α–β–σ au funcții reglatorii; γ e reprezentată de calmodulină - proteină ce fixează Ca^{2+} și care, în funcție de concentrația citoplasmică a acestuia, își modifică conformația.

Însăși enzima glicogen fosforilaz kinaza are două forme interconvertibile: transformarea formei inactive în activă are loc prin fosforilarea realizată la α și β, cu contribuția ATP și a kinazei (*Proteinkinaza dependentă de AMPc*). Se inactivează de către o *fosfoprotein fosfatază*. AMPc e mesagerul secund format ca răspuns la acțiunea adrenalinei, glucagonului care stimulează activitatea kinazei (AMPc dependentă), efectuînd

fosforilarea kinazei şi activînd C-Fb, concomitent fosforilînd-o şi accelerînd scindarea glicogenului. G-Fb în muşchi e activată de AMPc (modulator pozitiv), iar ATP este modulator negativ. Activitatea finală e determinată de raportul AMP/ATP. Glicogen fosforilaza "a" este AMP independentă.

Studiul roentgencristalografic al formelor "a " şi "b"ale glicogen fosforilazei au favorizat perceperea mecanismelor catalitice şi reglatorii ale acestei enzime cardinale a metabolismului. S-a stabilit că 841 de resturi de aminoacizi sunt aranjate compact în 3 domenii structurale: domeniul aminoterminal (310); domeniul fixator de glicogen (160) şi carboxiterminal (371). Centrul catalitic e localizat în adîncul subunităţii formate din resturile aminoacide ale celor 3 domenii, fiind apărat de mediul apos ce facilitează predominarea fosforilării faţă de hidroliză (fig.4.6).

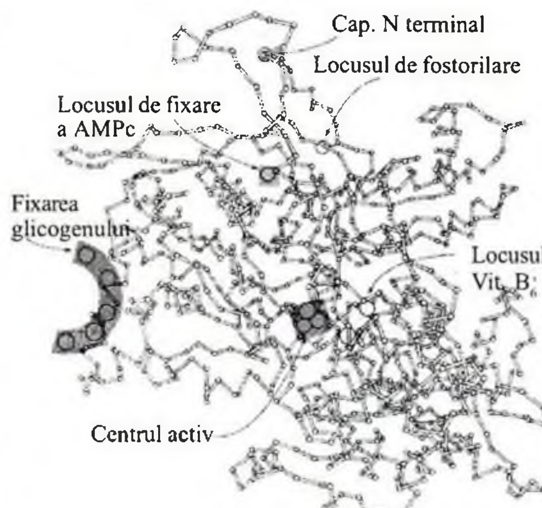


Figura 4.6. ***Imaginea schematică a carcasei α-carbonice din fosforilaza "a"***

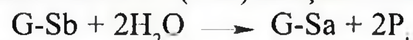
Vit.B_6 necesară pentru activitatea enzimei se fixează în apropierea locului de fixare a G-1-P. Molecula enzimei înlesneşte un locus de fixare a glicogenului la o depărtare de 30Å de la centrul activ, ce favorizează fosforilarea multor capete de glicogen, nedisociind şi resociind după fiecare ciclu catalitic. Conţine, de altfel, şi două locusuri alosterice de reglare la hotare între subunităţi (AMPc şi locusul de fosforilare a serinei). Enzima se studiază încontinuu, dar şi în prezent se poate afirma că ea reprezintă un integrator fin informativ al metabolismului energetic celular.

Proteinkinaza (PK) favorizează fosforilarea conform reacţiei:



$$G\text{-}Sa + 2ATP \longrightarrow G\text{-}Sb + 2ADP,$$

pe cînd fosfoprotein fosfataza (FPF) detaşează fosforul, activînd sintaza:



$$G\text{-}Sb + 2H_2O \longrightarrow G\text{-}Sa + 2P_i$$

Aceste două enzime reglatoare ale *glicogen sintazei* sunt identice cu cele două ale glicogen fosforilaz kinazei. De aceea, enzimele se reglează reciproc. O acţiune adiţională întreprinsă de celulă pentru a evita desfăşurarea simultană a defosforilării şi a fosforilării constă în inactivarea fosfoprotein fosfatazei de către o proteină – *inhibitorul de fosfatază*, activ prin fosforilare AMPc dependentă. Această fosforilare este realizată, însă, cu reziduu de treonină, nu şi de serină, ca în celelalte cazuri. Prin ataşarea inhibitorului de fosfatază la FPF este suprimată numai acţiunea hidrolitică a enzimei asupra reziduurilor de fosfoserină, nu şi asupra celor de fosfotreonină. G-S se reglează de către modulatorii alosterici, G-Sb se activează de către glucozo-6-fosfat şi această formă e denumită dependentă.

Sporirea concentraţiei de AMPc produsă prin activarea adenilatciclazei (activată de

glucagon şi adrenalină) activează proteinkinaza AMPc dependentă ce efectuează fosforilarea simultană a G-F-K, G-F, G-S şi a inhibitorului de FPF (ultimul inactivează FPF), excluzînd funcţionarea simultană a celor două enzime antagoniste (PK şi FPF). Procesul de glicogenoliză se va declanşa, suprimîndu-se sinteza (fig. 4.7).

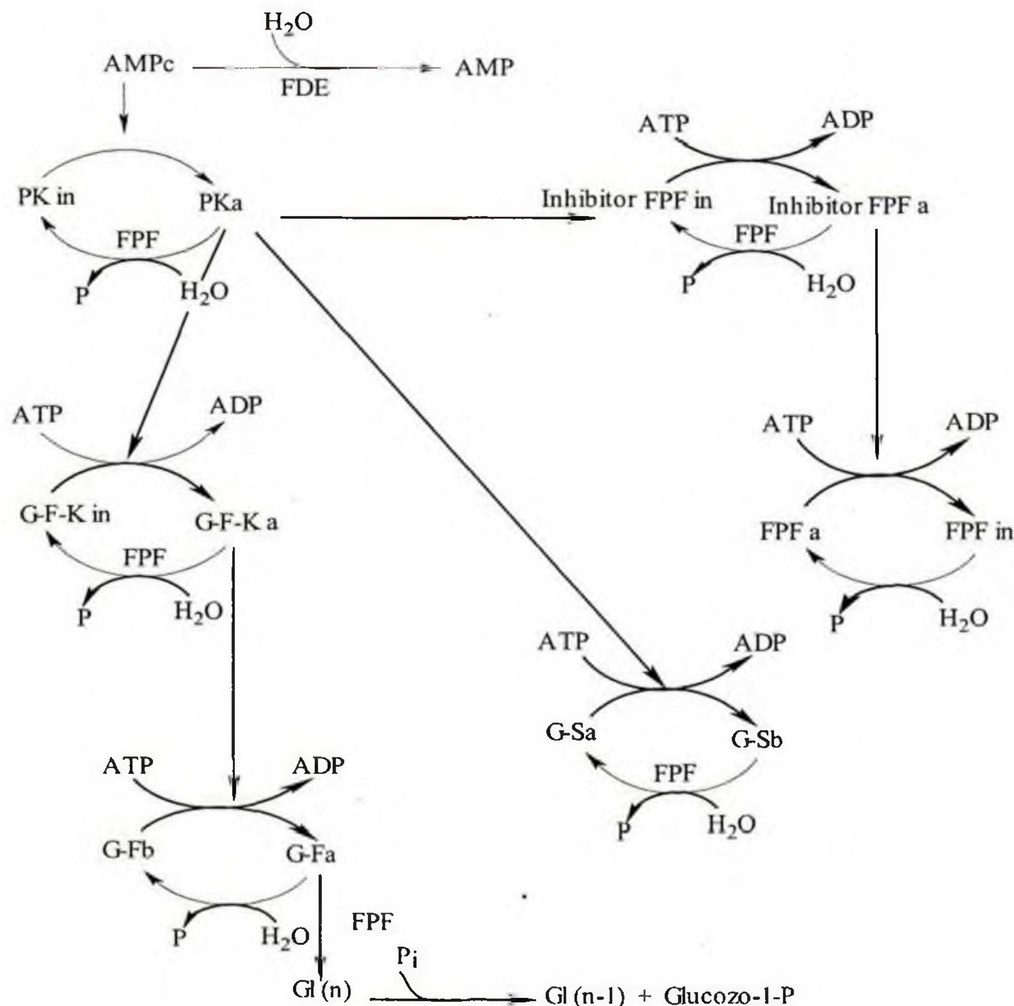


Figura 4.7. ***Reglarea sintezei şi lizei glicogenului***

Reducerea concentraţiei de AMPc (adică a concentraţiei de glucagon şi adrenalină) sau, respectiv, creşterea concentraţiei de insulină (activează fosfodiesteraza) inactivează proteinkinaza AMPc dependentă şi, deci, sistează fosforilarea G-F-K, G-F, G-S şi a inhibitorului FPF.

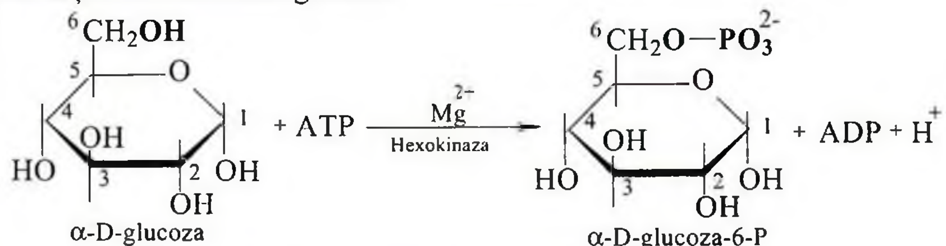
Inhibitorul devine inactiv, permite acţiunea FPF, care defosforilează cele trei enzime implicate în glicogenoliză. Ca urmare, G-S se activează. Activarea glicogenolizei coincide în timp cu inactivarea glicogen sintezei.

Glicoliza (calea Embden-Mejerhof)

Glucoza îndeplineşte roluri metabolice multiple în organism, fiind indispensabilă pentru el, şi serveşte drept combustibil excelent pentru ţesuturi. Utilizarea glucozei drept sursă de energie necesită parcurgerea glicolizei – degradarea ei incompletă pînă la piruvat şi, încontinuu, pînă la CO_2.

Calea centrală a catabolismului e universală, se deosebeşte prin caracterul reglării vitezei scindării şi prin evaluarea metabolică a piruvatului.

1. Reacţia de fosforilare a glucozei



Enzima fosforilării – *hexokinaza* – e prezentă în toate celulele, are o structură tridimensională, legarea se face după tipul inducţiei coordinative. Molecula enzimei suferă modificări conformaţionale profunde (fig. 4.8).

E reprezentată de izoforme diferite – toate catalizează aceeaşi reacţie, dar cu viteze diferite. Glucoza în muşchi fosforilează cu viteză maximă şi enzima e inhibată de G-6-P – produs şi inhibitor alosteric.



Figura 4.8. ***Imaginea schematică a α-scheletului de carbon din hexokinaza din drojdii. Două subunităţi identice interacţionează nesimetric***

În ficat, *glucokinaza* se caracterizează prin:

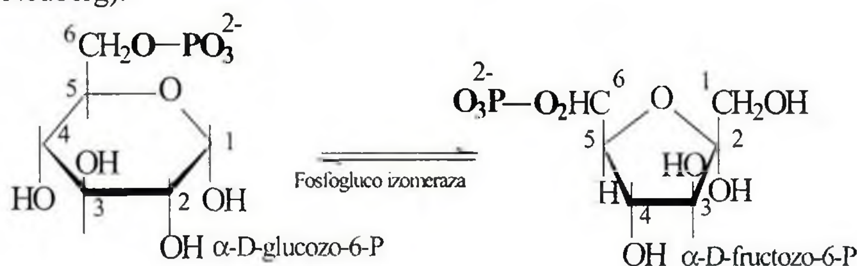
a) e specifică numai pentru D-glucoză;

b) G-6-P n-o inhibă;

c) conferă K_m mare (10mM), comparativ cu 0,10mM pentru hexokinază. E activă la concentraţii mari de glucoză, ce favorizează depunerea ei în glicogen. La bolnavii de *diabet zaharat* cantitatea glucokinazei e redusă, avînd consecinţe grave: nivelul glucozei în sînge e înalt, iar nivelul glicogenului în ficat e scăzut;

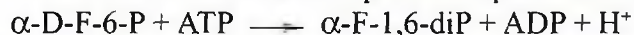
d) K_m mare oferă posibilitate creierului şi muşchilor să utilizeze glucoza primordial la o cantitate mică în sînge.

2. Următoarea reacţie reprezintă conversia glucozo-6-fosfatului la fructozo-6 fosfat (ester Neuberg).



Enzima *fosfogluco izomeraza* este o aldolază, ce necesită prezenţa Mg^{2+} şi transformă aldoza în cetoză. Grupa carbonil e transferată din poziţia 1 în 2.

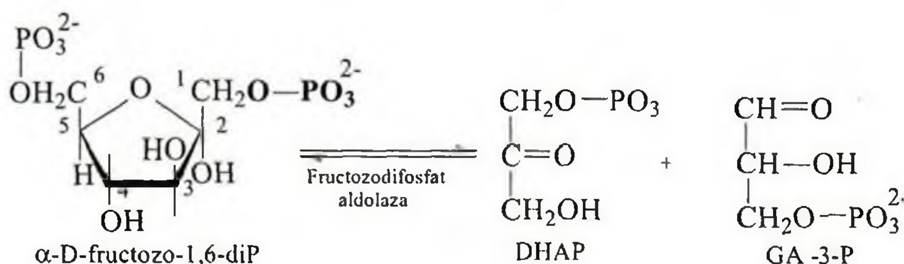
3. Fosforilarea fructozo-6-fosfatului este reprezentată prin următoarea reacţie:



$$\alpha\text{-D-F-6-P} + ATP \longrightarrow \alpha\text{-F-1,6-diP} + ADP + H^+$$

Enzima *fosfofructo kinaza* catalizează reacţia ireversibilă care prezintă un indice important de control al glicolizei. Reprezintă o enzimă compusă, inhibată de ATP, citrat, acizi graşi. Reacţia decurge lent şi determină viteza glicolizei, în ansamblu.

4. Scindarea fructozo-1,6-bifosfatului în 2 trioze:



Enzima e o *fructozodifosfat aldolază* (aldolază), ce nu necesită Mg^{2+}, dar la unele organisme necesită Zn^{2+}. Produsele sunt momentan utilizate în alte reacţii. Reacţia e dependentă de temperatură, fapt ce grăbeşte formarea rezultantelor.

5. Conversia triozelor fosforilate prezintă următoarea reacţie:

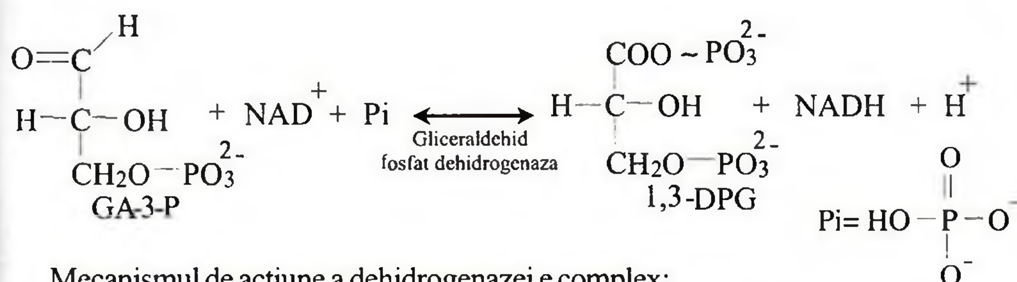


Enzima e o *triozofosfat izomerază*. Reacţia e deplasată spre formarea cetoformei – DHAP (95%), dar pe măsura utilizării gliceraldehid-3-P are loc formarea lui.

Aşadar, în cele 5 etape ce reprezintă prima fază a glicolizei, molecula de glucoză, utilizînd două molecule de ATP, s-a scindat în două trioze.

A doua fază a glicolizei, în care se includ cele două molecule de GA-3-P în aceleaşi reacţii chimice, sunt reacţii de oxido-reducere cuplate cu fosforilarea la nivel de substrat şi sinteză de ATP.

1) Oxidarea fosforilantă a gliceraldehid-3-fosfatului prezintă prima reacţie a acestei faze. Enzima e o *gliceraldehidfosfat dehidrogenază*. Grupa aldehid se oxidează şi nu se formează acidul carbonic, dar un amestec din anhidridă a acidului fosforic şi a acidului 3-fosfogliceric, adică 3-fosfoglicerolfosfat, care, de fapt, este un acilfosfat, ce se caracterizează printr-o valoare de $\Delta G = 11{,}8$kcal. O parte considerabilă a energiei libere, ce se elimină la oxidarea grupei aldehidice, se păstrează în grupa fosfat a acilfosfatului (la C-1).

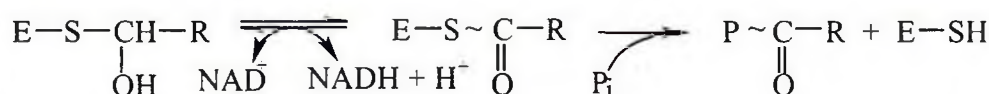


Mecanismul de acțiune a dehidrogenazei e complex:

a) adiția unei grupe SH din centrul activ al enzimei la gliceraldehid-3-fosfat, cu formarea unui semitioacetat (legătură covalentă):

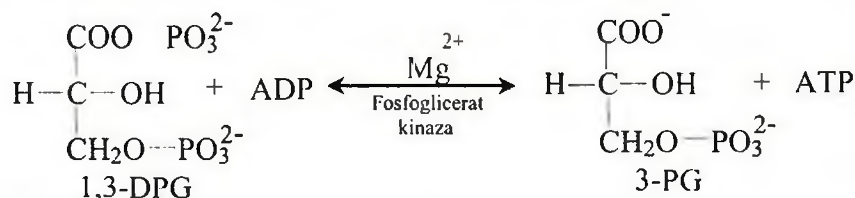


b) enzima transferă H^+ de la substrat la NAD^+, fixat rigid cu centrul activ. În urma transferului apare complexul macroergic acilfosfat, care ulterior interacționează cu P liber, generînd 3-P-G-P și regenerînd enzima liberă:



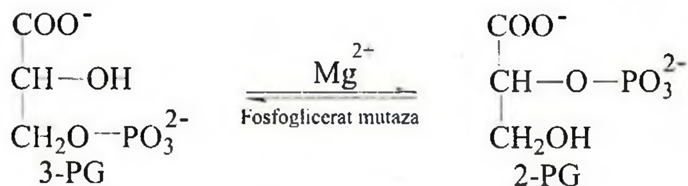
Enzima e compusă din 4 subunități identice. Fiecare lanț polipeptidic conține 330 aminoacizi. Grupele SH pot fi legate de iodacetat (ICH_2COOH) – inhibitor necompetitiv.

2) *Fosforilarea la nivel de substrat* (ΔG = -4,5kcal) este rezultatul transferului restului fosforil pe ADP, reacție catalizată de fosfoglicerat kinază:

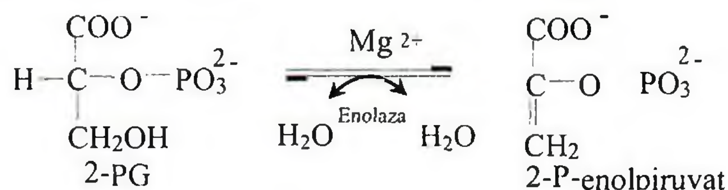


3) În continuare, are loc transformarea 3-fosfogliceratului în 2-fosfoglicerat, sub acțiunea unei *mutaze* specifice și în prezența obligatorie a ionilor Mg^{2+}:

(ΔG = +1,06 kcal)

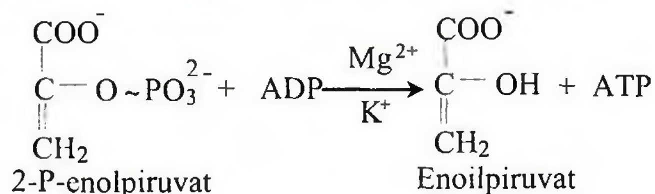


4) Enzima enolaza catalizează reacția reversibilă de dehidratare. În cadrul acestui proces are loc repartiția energiei în moleculă:



Modificările energiei libere în această reacție sunt $\Delta G = 4{,}2$ kcal ⟶ $\Delta G = -14{,}8$ kcal. Enzima este inhibată de fluorid (F^-) în prezența fosfatului. Realmente, *fluorid fosfatul* ce leagă ionii Mg^{++} este inhibitorul autentic.

5) Transformarea 2-fosfoglicerat în piruvat e catalizată de enzima *piruvat kinaza*. Are loc o *fosforilare la nivel de substrat*. Forma enol rapid se transformă în ceto (nefermentativ), ce predomină la pH = 7,0 ($\Delta G = -7{,}5$kcal/mol):



Reacția e deplasată în dreapta, forța motrice o constituie degajarea de energie. Reacția e ireversibilă.

În glicoliză se observă reacții chimice de 3 tipuri:

1) scindarea scheletului hidrocarburic al glucozei, cu formarea piruvatului (via C);

2) fosforilarea ADP de compuși SME (via P);

3) via transferului de electroni (via H).

E de menționat că:

1. Enzimele ce catalizează reacțiile glicolitice în citozol sunt solubile.

2. De la glucoză pîna la piruvat sunt antrenați 9 metaboliți intermediari fosforilați, care îndeplinesc următoarele funcții:

a) la pH=7,0 fosfatul poartă sarcină negativă, membranele celulare sunt impermeabile pentru moleculele cu sarcină și, deci, intermediarii glicolizei nu pot părăsi celula. Glucoza, lactatul, piruvatul au sisteme de transport specifice;

b) acești metaboliți reprezintă componentele necesare în procesul fermentativ de acumulare a energiei metabolice – transferul la ADP, cu sinteză de ATP;

c) grupele fosfat îndeplinesc funcții de identificare, fapt ce atestă că moleculele produselor intermediare ale glicolizei ocupă o poziție justă față de centrul activ al enzimelor corespunzătoare. Aproape toate enzimele necesită ioni de Mg^{++}, care formează complexe cu grupele fosfat în ADP, ATP, la fel ca și intermediarii glicolizei. O anumită specificitate manifestă față de complexele cu ioni de Mg^{++}.

Soarta piruvatului. *Piruvatul* se află la răscrucea drumurilor metabolice. Poate fi utilizat în următoarele direcții:

1. La organismele *aerobe* e supus decarboxilării oxidative – calea studiată mai sus. Reacția sumară a degradării este schematic redată în continuare:

Glucoza + $2P_i$ + 2ADP + $2NAD^+$

Calea Embden-Mejerhof

2 piruvat + 2ATP + 2NADH + $2H^+$ + $2H_2O$

2 SHCoA | $2NAD^+$

Decarboxilarea oxidativă

$2CO_2$; 2NADH + 2H → (3x2) → 6 molecule ATP

$\frac{(3x2)}{(2x2)}$ → $\frac{6}{4}$ molecule ATP

$2CH_3-C(=O)\sim SCoA$

Ciclul Krebs și fosforilarea oxidativă

2 x (3NADH + $FADH_2$ + ATP)

2 x (2+9+1) = 2 x 12 molecule ATP

2 ; 6 ; 24 ; 6(4)

38 sau 36 molecule de ATP



Teoretic, eliberarea energiei libere are un randament egal cu:

$$38 \times 7{,}3 / 686 \times 100\% = 40\%$$

În celula intactă eficacitatea transformărilor e și mai mare = 70%, cauzată de concentrația intracelulară a O_2, concentrația P, ADP, ATP nu e egală, dar mai mică decît 1,0M.

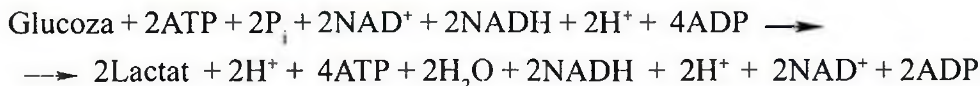
2. *În condiții anaerobe* are loc reducerea piruvatului în lactat – *glicoliza anaerobă* – sursă principală a ATP la efort fizic:

$$\text{Piruvat} + NADH + H^+ \rightleftharpoons \text{Lactat} + NAD^+$$

Necesarul de NADH este asigurat de oxidarea gliceraldehid -3-fosfatului. Reacțiile au loc în mod coordonat și permit generarea imediată a energiei.

Reacția este deplasată spre dreapta. NAD^+ regenerat poate fi utilizat în glicoliză. Enzima reprezintă lactat dehidrogenaza. Am mai menționat că ea este o *izoenzimă*, ce diferă după K_m pentru piruvat, V_{max} și gradul de inhibiție alosterică de piruvat. Izoenzima ce conține 4 subunități identice (H_4) este LDH_1, care are o K_m mică pentru piruvat și este inhibată puternic de acesta. Forma compusă din unități identice – (M_4) - LDH_5 – are K_m mare, nu se inhibă de piruvat și are o activitate catalitică mult mai mare decît LDH_1.

Stoichiometria glicolizei anaerobe:



$$\text{Glucoza} + 2ATP + 2P_i + 2NAD^+ + 2NADH + 2H^+ + 4ADP \longrightarrow$$

$$\longrightarrow 2\text{Lactat} + 2H^+ + 4ATP + 2H_2O + 2NADH + 2H^+ + 2NAD^+ + 2ADP$$



Sumar: $\text{Glucoza} + 2P_i + 2ADP \longrightarrow 2\text{Lactat} + 2ATP + 2H^+ + 2H_2O$

Obținerea unei cantități mici de ATP eliberată rapid este avantajoasă pentru necesitățile imediate de energie sau activitatea unor țesuturi cu necesități energetice minime. În țesuturile anaerobe, inclusiv și în ficat, acidul lactic este transformat în acetil-CoA și utilizat ca substrat în ciclul Krebs.

3. O altă cale de metabolizare este *sinteza etanolului*. Unele microorganisme, de exemplu drojdiile, fermentează glucoza la fel pînă la piruvat. Apoi:



a) $\text{Piruvat} + HOH \longrightarrow CH_3{-}CH{=}O + CO_2$

Enzima e *piruvat decarboxilază* (Mg^{2+}, TPP). Reacția în celulă e ireversibilă. Enzima nu se conține în țesuturile animale.



b) $CH_3{-}CH{=}O + NADH + H^+ \rightleftharpoons CH_3CH_2OH + NAD^+$

Enzima reacției este *alcool dehidrogenază*. În 1856, Louis Pasteur a argumentat fermentația zahărului în alcool, prin acțiunea microorganismelor. În condiții sterile, fermentația nu are loc. De pe bobițele de poamă proaspete s-a izolat cultura de drojdie și s-a determinat că ea e responsabilă de fermentația sucului. Transformarea vinului în oțet e cauzată de alte microorganisme.

Reglarea glicolizei. Viteza reacțiilor catabolice principale ce asigură scindarea glucozei și utilizarea energiei chimice sub forma de ATP, în fiecare moment se reglează în corespundere cu necesitățile celulei în ATP, indiferent de calea în continuare a utilizării ATP – biosinteza, transfer activ sau lucru mecanic. Enzimele reglatoare percep diferite semnale ale căilor metabolice și sunt receptive la ele.

Prima reacție reglatoare (1) e catalizată de *hexokinaza* ce fosforilează glucoza liberă cu ajutorul ATP în poziția 6. E o enzimă alosterică ce se inhibă de G-6-P. Glucokinaza ficatului nu se inhibă, și surplusul de glucoză e transformat prin G-1-P în glicogen. În condiții normale, insulina stimulează sinteza glucokinazei. În inaniție și diabet, activitatea glucokinazică e redusă.

Reglarea majoră (2) a glicolizei e determinată de activitatea fosfofructo kinazei, enzimă alosterică conjugată, reglată de un număr suficient de modulatori pozitivi și negativi. Activitatea ei e dependentă de concentrația substraturilor (ATP și F-6-P), produselor (ADP și F-1-6-diP). Sunt semnificativi AMP, citratul, Mg^{2+}, fosfatul și alți metaboliți. Principalii modulatori negativi sunt ATP și citratul, pozitivi – AMP, F-1,6-diP.

Ca rezultat al acțiunii alosterice, viteza reacțiilor crește de sute de ori la trecerea mușchiului din stare de repaus în stare activă. Cu alte cuvinte:

1) stimularea glicolizei are loc în condițiile unei sarcini energetice mici în celula ce solicită energie;

2) conținutul mare de *citrat*, ca o consecință a surplusului de compuși ce joacă rolul de precursori ai energiei. În final, scindarea glucozei nu e oportună;

3) un suficient efector alosteric pozitiv constituie *F-2,6-difosfatul*, integrator metabolic sintetizat de o enzimă bifuncțională: fosfofructo-2-kinaza/fructozo-2,6-difosfataza

(PF-2-K/F-2,6-diP-aza) (fig. 4.9). Enzima a fost izolată şi secvenţionată, include 470 aminoacizi care pot fi divizaţi în două domenii: kinazic – aminoterminal (1-249) şi cel fosfatazic – C terminal (250-470).

Enzima se reglează covalent prin interconversie fosforilare – defosforilare. La fosforilare este acţionată de proteinkinaza A (AMPc dependentă).

Activitatea kinazei scade, în timp ce activitatea fosfatazei creşte. Concentraţia hepatică a F-2,6-diP este controlată de doi factori majori: F-6-P şi AMPc.

F-6-P măreşte concentraţia de F-2,6-diP, prin activarea alosterică a PF-2-kinazei şi inhibiţia F-2,6-difosfatazei, conducînd la stimularea glicolizei şi inhibiţia gluconeogenezei. AMPc scade concentraţia de F-2,6-difosfat, inactivînd via PK-A (PF-2-K inactivă - fosforilată) şi activează simultan F-2,6-difosfataza (activă - fosforilată).

Glucagonul, reducînd concentraţia de F-2,6-difosfat, inhibă glicoliza, lipogeneza şi activează gluconeogeneza. *Insulina* inhibă gluconeogeneza, lipoliza şi stimulează glicoliza (fig.4.9).

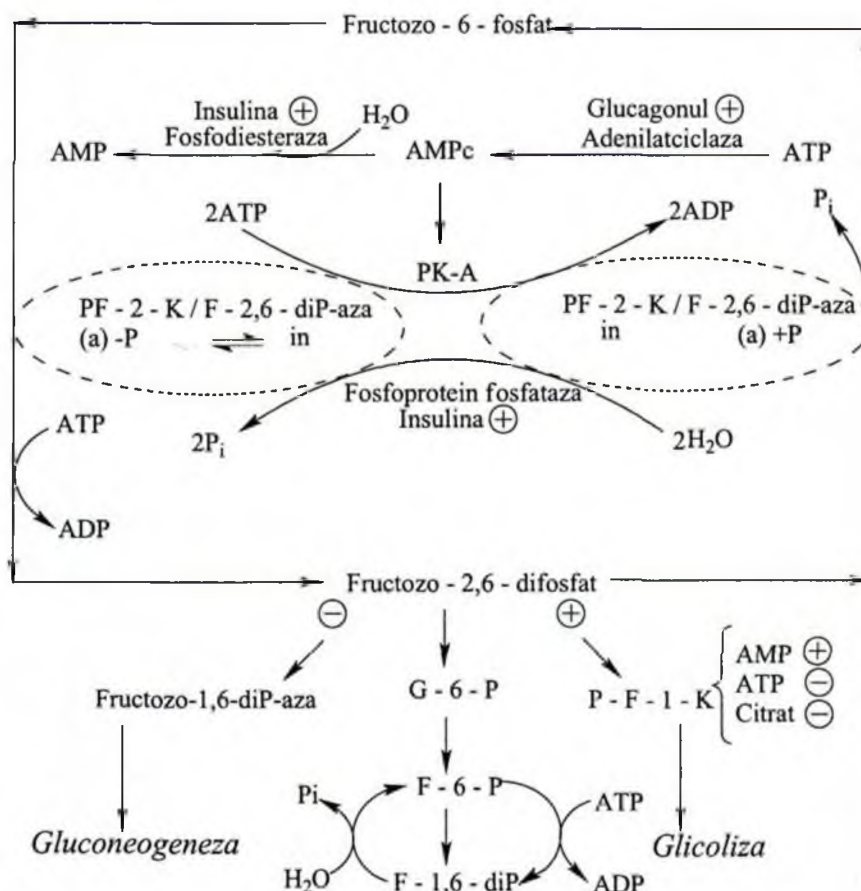


Figura 4.9. ***Rolul reglator al fructozo-2,6-difosfatului***

O altă reacţie reglatoare e cea piruvat kinazică (3). Piruvat kinaza este o enzimă alosterică. Se află în trei izoforme, ce diferă după repartiţia lor în ţesuturi şi receptivitatea

la diferiți modulatori. L-forma predomină în țesuturi capabile de gluconeogeneză (ficat, rinichi). Enzima e inhibată și de alanină. În condiții de aprovizionare suficientă cu energie și precursori de glucoză, glicoliza se inhibă creînd o situație favorabilă gluconeogenezei. Este inhibată de ATP, acetil-CoA, acizi grași cu greutate moleculară mare. M-forma nu posedă o atare reglare.

Glicoliza se reglează subtil, foarte complicat și nu e de mirare, deoarece reprezintă cea mai veche cale metabolică, fiind una din pozițiile principale. *Glicoliza, ciclul Krebs, fosforilarea oxidativă sunt coordonate între ele, funcționînd în regim de autoreglare și economie maximă.* În celulele cancerigene e dereglată coordonarea lor și glicoliza e accelerată, formînd mult lactat.

Patologiile medicale

Mutațiile la nivelul genei pentru *glucokinază* cauzează apariția unei boli monogenetice, cu debut precoce: diabetul zaharat de tip MODY-2. Diminuarea activității glucokinazei cauzează scăderea fluxului glicolizei în ficat și pancreas, care determină creșterea glicemiei și hipersecreția reacțională de insulină. Cu toate acestea, nivelul insulinei sintetizate de către pancreas este mult diminuat, ca urmare a deficitului energetic la nivelul celulelor beta ale pancreasului.

În ficat are loc diminuarea glicogenogenezei și amplificarea gluconeogenezei, ca răspuns la reducerea ratei glicolizei. Aceste perturbări explică hiperglicemia persistentă observată la pacienți.

Deficitul *piruvat kinazei* cauzează blocarea întregului flux al intermediarilor la nivelul glicolizei. Manifestările clinice constau în apariția unei anemii hemolitice ereditare, datorită imposibilității desfășurării glicolizei în eritrocite.

Enolaza este inhibată sub acțiunea fluorurii de sodiu, care acționează ca inhibitor competitiv, blocînd glicoliza și producerea acidului lactic în hematii. Cu toate că structura NaF nu seamănă cu cea a 2-fosfogliceratului, se consideră că efectul inhibitor se datorează formării unui complex între fosfat, Mg^{2+} și NaF, care blochează accesul substratului la centrul activ al enzimei. Acest inhibitor este utilizat frecvent în laboratoarele clinice, deoarece permite dozarea corectă a glicemiei, prin blocarea utilizării glucozei plasmatice de către eritrocitele prezente în proba recoltată. În caz contrar, consumul glucozei și producerea acidului lactic în hematii conduc la rezultate incorecte în cursul dozărilor efectuate.

Deficitul *piruvat dehidrogenazei* sau blocarea lanțului respirator mitocondrial antrenează acumularea excesivă a acidului piruvic provenit din glicoliză. Acesta va fi convertit în acid lactic sub acțiunea lactatdehidrogenazei. Creșterea nivelului de acid lactic în circulație determină apariția acidozei lactice, care poate fi primară sau secundară.

Deficitul ereditar al lactat dehidrogenazei cauzează apariția unei miopatii metabolice, manifestată prin reducerea nivelului seric al lactatului și intoleranță la efort fizic.

Distribuția izoenzimelor tisulare de LDH este variabilă. LDH_1 și LDH_2 sunt principalele izoforme în inimă, rinichi, creier și eritrocite. LDH_3 și LDH_4 sunt predominante în glandele endocrine (tiroida, suprarenale, pancreas), splină, timus, leucocite, trombocite. LDH_4 și LDH_5 preponderent se află în ficat și mușchii scheletali. Distribuția normală a izoenzimelor LDH în serul sanguin este următoarea:

$LDH_1 < LDH_2 > LDH_3 > LDH_4 <=> LDH_5$

În *infarctul miocardic* creşte atît LDH_1, cît şi LDH_2, dar $LDH_1 > LDH_2$. Se constată creşterea LDH_3 cu predominarea faţă de LDH_2 în maladiile neoplastice, limfoproliferative şi ale trombocitelor. LDH_2 şi LDH_3 se majorează în *infarctul pulmonar*. Valori majore ale LDH_5 se depistează în afecţiunele ficatului şi muşchilor scheletali.

Acidoza lactică constituie un sindrom metabolic caracterizat prin acumularea acidului lactic în sînge (valori care depăşesc 5 mmol/L), concomitent cu scăderea pH-ului sanguin sub 7,2. Cele mai frecvente cauze care duc la apariţia acidozei lactice sunt:

a) deficitul ereditar al piruvat dehidrogenazei sau carenţa de vitamina B_1;

b) imposibilitatea regenerării formei oxidate a coenzimei NAD^+ la nivelul lanţului respirator mitocondrial, prin deficitul unuia din complexele lanţului transportator de electroni sau prin blocarea fosforilării oxidative;

c) producerea exesivă de NADH, de exemplu în caz de intoxicaţie cu alcool;

d) blocarea utilizării acidului lactic pentru gluconeogeneză în caz de deficit al enzimelor gluconeogenezei, de exemplu deficitul piruvat carboxilazei, responsabilă de iniţierea gluconeogenezei, deficitul glucozo-6-fosfatazei;

e) accentuarea marcată a glucozei anaerobe, de exemplu în caz de efort fizic prelungit.

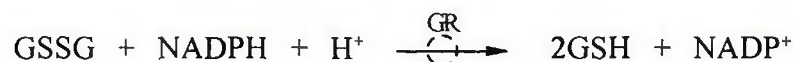
Acidoza lactică secundară se întîlneşte în toate situaţiile caracterizate prin hipoxie sau anoxie prelungită, şoc, hipoperfuzie, insuficienţă cardiovasculară, precum şi în carenţele de vitamină B_1.

Tratamentul constă în mărirea ratei de perfuzie tisulară, respectiv administrarea vitaminei B_1. Se depistează o acidoză lactică şi a altor acizi organici la pacienţii cu afecţiuni ale intestinului subţire (malabsorbţia, bypass jejunial, rezecţia intestinală). D-lactatul este produsul bacteriilor anaerobe, care apoi, prin via portală, este vehiculat în circulaţie. În terapia acestor maladii se vor utiliza antibioticele, se va limita folosirea carbohidraţiilor şi e necesară recolonizarea florei bacteriene.

Acidoza primară va apărea la deficitul uneia din subunităţile piruvat dehidrogenazei şi se manifestă încă în perioada neonatală prin creşterea marcată a acidului lactic în circulaţie (mai mare decît 5mmol/L) şi deficit energetic tisular, în special în organele cu activitate metabolică intensă (insuficienţă hepato-renală, encefalopatie metabolică, etc.). Tratamentul vizează administrarea substanţelor nutritive de natură lipidică, a căror oxidare este independentă de complexul piruvat dehidrogenazic.

Căile alternative de degradare a glucozei. Calea pentozo-fosfaților (șuntul pentozo-fosfat - HMS)

Premisa biologică primordială, la care etapele oxidative sunt catalizate de dehidrogenazele NADP dependente, este producerea NADPH necesară biosintezelor reductive. Se desfășoară în fracția citoplasmatică, consumatorul major fiind biosinteza acizilor grași, proces localizat de asemenea în citoplasmă, ca și biosinteza colesterolului, hormonilor steroizi, hidroxilarea unor compuși străini organismului. Reducerea *glutationului*, care are importanță majoră pentru menținerea integrității enzimelor tiolice și prevenirea peroxidării lipidice, se realizează pe seama NADPH, cofactor al *glutation reductazei (GR)*:



$$GSSG + NADPH + H^+ \xrightarrow{GR} 2GSH + NADP^+$$

Calea HMS este accelerată la maximum în țesuturi, unde lipogeneza, sinteza hormonilor steroizi sunt deosebit de intense (țesutul adipos, glanda mamară, ficat, suprarenale – porțiunea corticală). HMS furnizează de asemenea pentoze necesare biosintezei nucleotidelor și acizilor nucleici.

Desfășurarea acestei căi implică 2 etape majore:

1) conversia hexozelor la pentoze (etapa oxidativă);

2) conversia pentozelor în hexoze (etapa nonoxidativă).

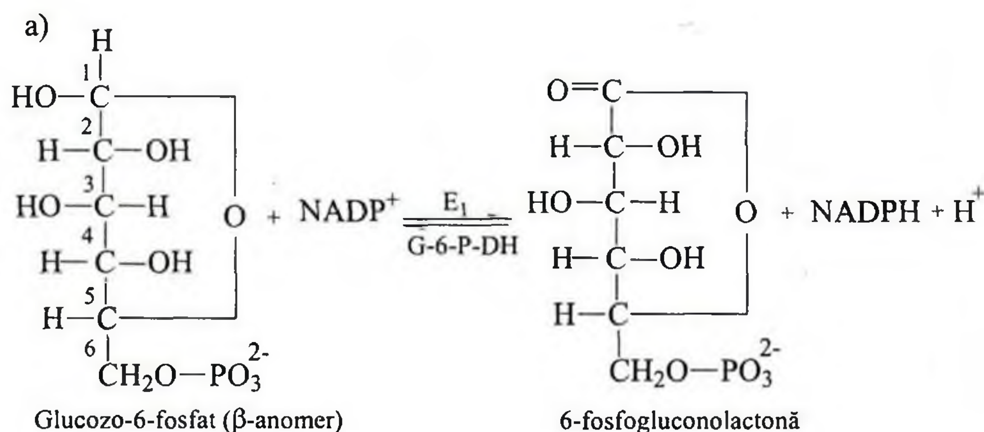
Etapa oxidativă. Conversia este inițiată de oxidarea:

a) G-6-P în 6-fosfoglucolactonă de G-6-P DH NADP dependentă;

b) o *lactonază* (E_2) hidrolizează produsul în acidul 6-fosfogluconic, la etapa ulterioară;

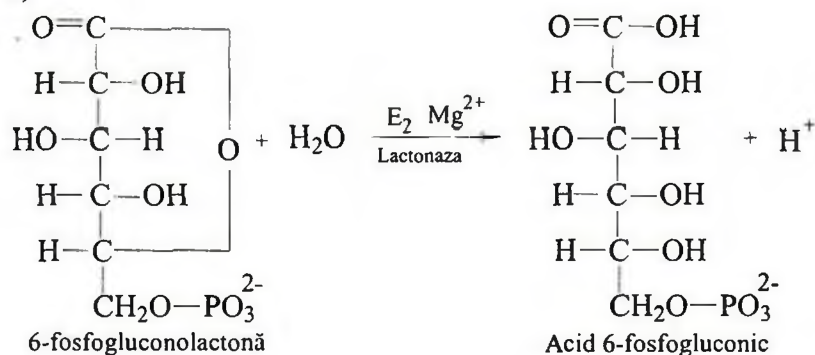
c) o enzimă NADP dependentă realizează oxidarea decarboxilantă a substratului, cu formarea ribulozo-5-fosfat.

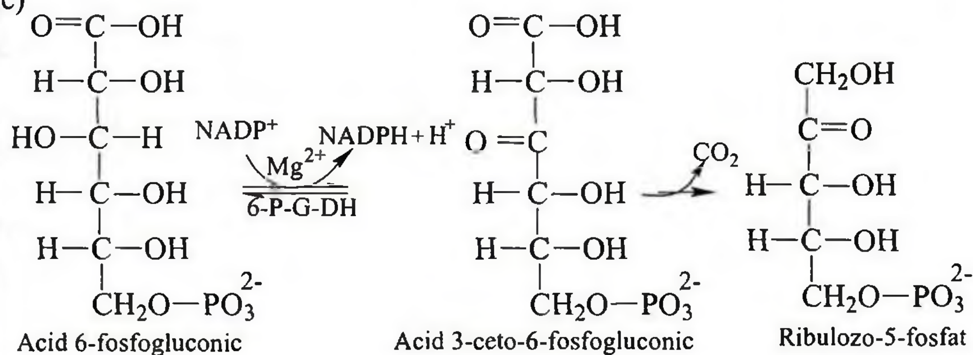
Cele trei reacții, cu cofactorii și enzimele respective, sunt redate mai jos (a, b, c).



Glucozo-6-fosfat (β-anomer) 6-fosfogluconolactonă

Activitatea ultimei enzime (E_3) e inhibată de fructozo-1,6-diP, substrat al glicolizei, iar 6-fosfogluconatul, substratul ei, este inhibitor al 6-fosfogluco izomerazei.



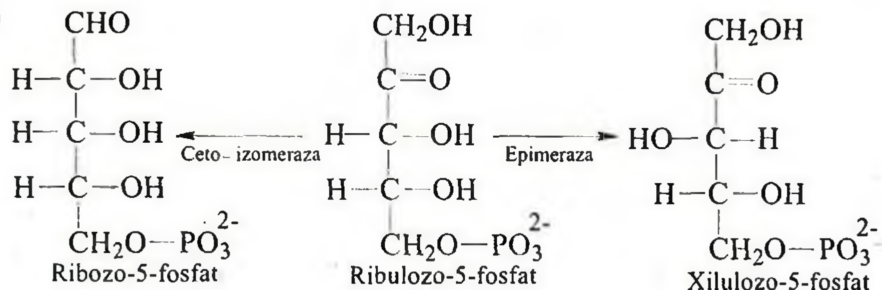


Reacția sumară prezintă:



$$\textbf{G-6-P + 2NADP}^{+} \textbf{ + H}_2\textbf{O} \rightleftharpoons \textbf{R-5-P + 2NADPH + 2H}^{+} \textbf{ + CO}_2 \textbf{ (1)}$$

Ribulozo-5-fosfatul este convertit în epimerul său *xilulozo-5-P (epimeraza)*, ca și la aldoizomerul său *(R-5-P-ceto-izomeraza)* (d):



Pentozele rezultate sunt utilizate în sinteza acizilor nucleici, a coenzimelor compuşilor macroergici sau metabolizate în continuare. La o necesitate echilibrată NADPH şi pentoze, pentozo-fosfaţii parcurg exclusiv etapa transformării hexozelor în pentoze.

Etapa nonoxidativă. Conversia pentozei în hexoze, la un exces faţă de necesitate a pentozelor, e catalizată de *transcetolază* şi *transaldolază*. Aceste enzime leagă reversibil şuntul pentozo-fosfat şi glicoliza:



1. Ribozo–5–P + Xilulozo–5–P ⇌ Sedoheptolozo–7–P + GA–3–P

Transcetolaza, în calitate de grupă prostetică, conţine TPP. Enzima posedă acelaşi mecanism catalitic ca şi complexul PDH şi constă în transferul fragmentului activ aldehidic (CH_2OH–CH=O) pe acceptor, drept care serveşte aldoza (Ribozo–5–P). Insuficienţa tiaminei în raţia alimentară poate provoca dereglări neuro-psihice (*sindromul Wernicke-Korsakoff*).

Sindromul în cauză apare numai la o anumită parte a alcoolicilor sau la persoane cu dereglări grave de nutriţie. S-a constatat că la sindromul Wernicke-Korsakoff insuficienţa de vit.B_1 rezidă în factorii genetici: capacitatea de fixare a tiaminei la aceşti bolnavi e de zeci de ori mai redusă decît la sănătoşi, pe cînd celelalte enzime dependente de B_1 nu suferă modificări. Dereglările activităţii enzimei se manifestă clinic numai dacă concentraţia tiaminei e foarte mică pentru saturarea enzimei.

O altă enzimă – *transaldolaza* – transferă DHA (CH_2OH–CO–CHOH) de la cetoză (donator) la aldoză – acceptor. Enzima nu conţine grupă prostetică. La interacţiunea grupei carbonil a cetozei, substrat cu E-aminogrupa lizinei din centrul activ al transaldolazei, se formează baza Schiff. Acest tip de interacţiune covalentă ES (enzima-substrat) a produsului intermediar este identic cu produsul reacţiei fructozobifosfat aldolazică în glicoliză:



2. S - 7 - P + GA - 3 - P ⇌ Ert - 4 - P + G - 6 - P (F - 6 - P)

La etapa următoare, *transcetolaza* transferă grupa aldehidică a Xil-5-P, cu formarea:

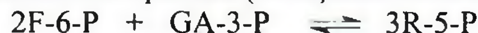


3. Ert - 4 - P + Xil - 5 - P ⇌ G - 6 - P + GA - 3 - P

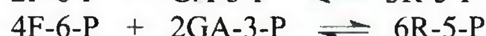
Sumar: **3 pentoze ⇌ 2hex. + 1trioza sau în 3R-5-P ⇌ 2F-6-P + GA-3-P.**

Deci, 6 pentoze ⇌ 4 hexoze + 2 trioze.

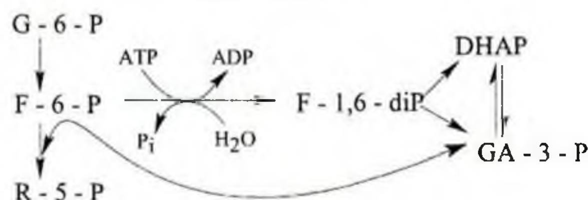
Surplusul de R-5-P format în HMS poate fi cantitativ transformat şi în produse intermediare ale glicolizei. În caz de minimă necesitate de NADPH, are loc doar conversia hexozelor în pentoze (la creşterea necesităţii ultimelor).



2F-6-P + GA-3-P ⇌ 3R-5-P



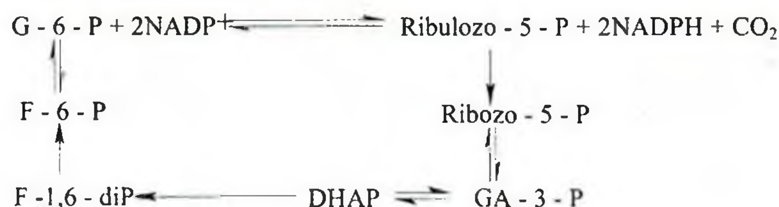
4F-6-P + 2GA-3-P ⇌ 6R-5-P



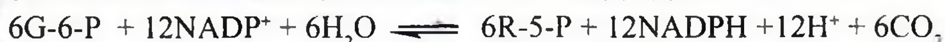


5G-6-P + P_i ⇌ 6R-5-P + H_2O (2)

Apar situaţii în care necesităţile de NADPH sunt cu mult mai mari decît în pentoze. În aşa cazuri devin active următoarele reacţii: pe calea şuntului pentozo-fosfat se formează 2NADPH şi ribozo-5-fosfat. Apoi, sub acţiunea *transcetolazei* şi *transaldolazei*, R-5-P este convertit în F-6-P şi GA-3-P şi, în final, are loc resinteza G-6-P din compuşii premergători, pe calea gluconeogenezei:



Şi, în sumar, conform reacţiilor descrise mai sus (1) şi (2), concluzionăm:



$$6G\text{-}6\text{-}P + 12NADP^+ + 6H_2O \rightleftharpoons 6R\text{-}5\text{-}P + 12NADPH + 12H^+ + 6CO_2$$



$$6G\text{-}6\text{-}P + 12NADP^+ + 6H_2O \rightleftharpoons 5G\text{-}6\text{-}P + 12NADPH + 12H^+ + 6CO_2 + P_i$$



Şi, în final: $$\mathbf{G\text{-}6\text{-}P + 12NADP^+ + 7H_2O \rightleftharpoons 12NADPH + 12H^+ + 6CO_2 + P_i}$$

HMS şi celulele roşii ale sîngelui. Şuntul e foarte activ în eritrocitele omului. NADPH protejează acizii graşi nesaturaţi de interacţiunea anormală a O_2 (în membrană) şi asigură gradul de oxidare a Fe^{2+} în hemoglobină. La insufucienţa de G-6-P-DH apare o hemoliză patologică (fig. 4.10), determinată de gradul mic de reducere a glutationului. În consecinţă, eritrocitele sunt expuse la efectele nocive ale radicalilor liberi.

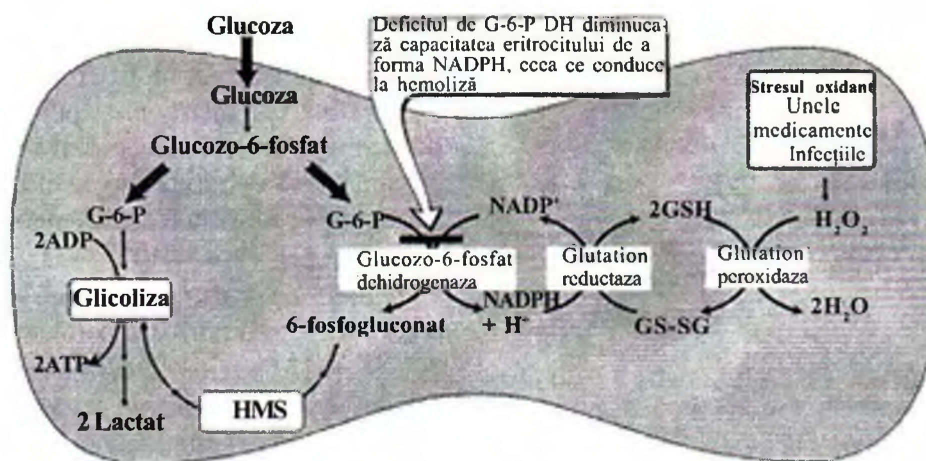


Figura 4.10. ***Rolul glucozo-6-fosfatului în metabolismul eritrocitar***

Deosebit de activ e HMS în celulele fagocitare, unde participă în liza bacteriilor şi a celulelor anormale. $NADPH + 2O_2 \rightarrow 2O_2^- + NADP^+ + H^+$. Enzima ce catalizează această reacţie este o NADP-oxidază. În fagolizozom anionul superoxid generează

spontan peroxidul de hidrogen, substrat pentru mieloperoxidază, prezentă în granulele neutrofile primare. În prezența metalelor (surplus de fier) peroxidul de hidrogen şi anionul superoxid va genera radicalul hidroxil şi oxigenul singlet ($^{\bullet}O_2$):

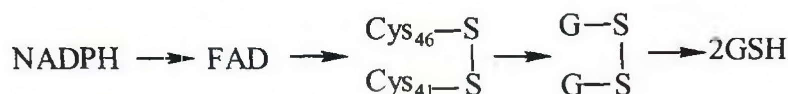


$$O_2^- + H_2O_2 \longrightarrow {}^{\bullet}O_2 + OH^- + OH^{\bullet}$$

Radicalul hidroxil (OH) este foarte activ şi va oxida diferite molecule biologice.

În *glicogenoza de tip I* (anomalie a degradării glicogenului) are loc acumularea excesivă a glucozo-6-fosfatului, ca urmare a deficitului de glucozo-6-fosfatază. Excesul de glucozo-6-fosfat determină activarea continuă a căii pentozofosfat, rezultînd cantități excesive de ribozo-5-fosfat şi, implicit, de nucleotide purinice. Degradarea acestora provoacă hiperuricemia (creşterea concentrației acidului uric în sînge), precum şi precipitarea acidului uric în țesuturi.

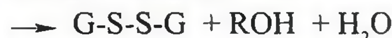
Şuntul din eritrocite e singura sursă de NADPH. Intrînd în componența glutation reductazei, e⁻ se transferă de la NADPH la FAD, apoi la punțile disulfidice în subunitate şi apoi pe glutationul oxidat:



$$NADPH \longrightarrow FAD \longrightarrow \begin{matrix} Cys_{46}-S \\ | \\ Cys_{41}-S \end{matrix} \longrightarrow \begin{matrix} G-S \\ | \\ G-S \end{matrix} \longrightarrow 2GSH$$

GR reprezintă un dimer, subunitățile căruia au o masă moleculară de 50 kDa (fig.4.11). Fiecare subunitate se constituie din trei domenii structurale: fixator de FAD, NADPH şi domeniul intermediar. Relația GSH/G-S-S-G, în condiții normale, este egală cu 500.

S-a subliniat că GSH joacă un rol deosebit în procesele de detoxicație, conform reacției:



$$2GSH + R\text{-}OOH \longrightarrow G\text{-}S\text{-}S\text{-}G + ROH + H_2O$$

GSH este utilizat în inactivarea potențialului de distrugere a peroxizilor organici (peroxidarea acizilor graşi nesaturați) şi a peroxidului de hidrogen, rezultant al acțiunii superoxiddismutazei:



$$2O_2^- + 2H^+ \longrightarrow H_2O_2 + O_2$$

Glutation peroxidaza, enzimă selenoconstituentă, neutralizează peroxidul:



$$2GSH + H_2O_2 \longrightarrow G\text{-}S\text{-}S\text{-}G + 2H_2O$$

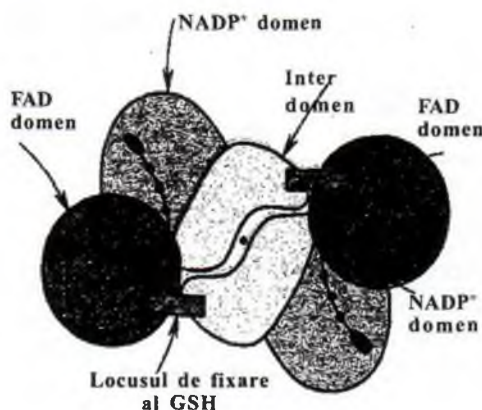


Figura 4.11. ***Imaginea schematică a structurii domenice în glutation reductază***

Defectele genetice în activitatea *γ-glutamil cistein sintazei* şi *glutation sintazei* sunt cauzele anemiilor hemolitice. De asemenea, deficiențele nutriționale în riboflavină sau *selenium* determină anormalitățile din metabolismul glutationului. O ameliorare parțială se obțin la folosirea *viaminei E* şi a antioxidanților. Scăderea nivelului glutationului redus se depistează în *favism (deficit congenital de G-6-PDH)* – leziune metabolică, unde indivizii prezintă o mare sensibilitate la sulfamide sau medicamente antimalaricele cu declanşarea unor manifestări hemolitice generalizate.

Sinteza acidului glucuronic. *Calea acidului glucuronic* este un proces ce implică activarea glucozo-1-fosfat, conform reacției:



1)G-1-P + UTP $\xrightarrow{E}$ UDP-glucoza + PP_i

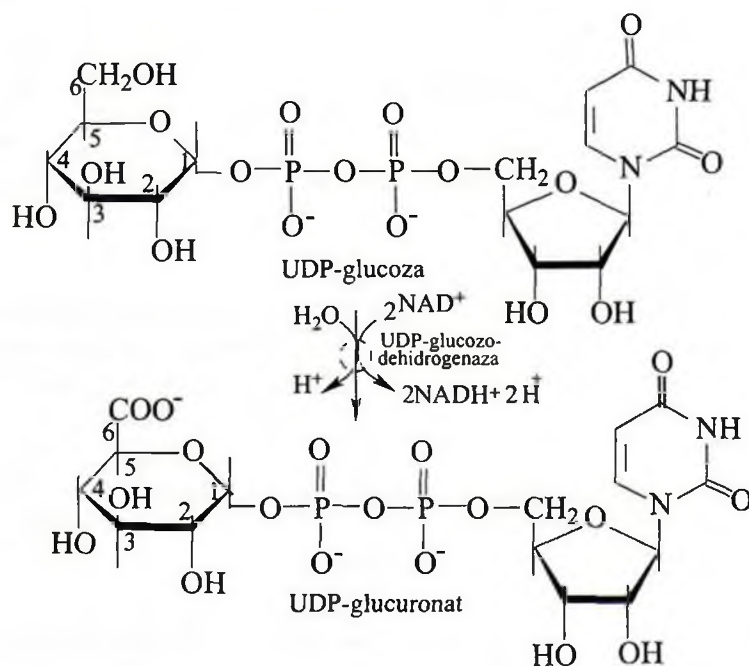
Activitatea enzimei *UDP-glucozo pirofosforilază* necesită Mg^{2+}. UDP-glucoza servește ca donator de glucoză la sinteza di- și polizaharidelor sau poate fi oxidată în UDP-glucuronat.



2)UDP-glucoza + $2NAD^+$ + H_2O $\rightleftharpoons$ 2NADH + $3H^+$ + UDP-glucuronat

Enzima – *dehidrogenaza NAD⁺dependentă* – catalizează reacția de formare a glucuronatului activ, care se utilizează la:

a) conjugarea a diverși compuși endo- și exogeni din clasa aminelor, fenolilor, acizilor carboxilici. Reacțiile sunt catalizate de enzimele *glucuronil transferaze* din ficat și reprezintă o etapă de detoxifiere a compușilor străini (xenobiotice) sau proprii organismului, formînd glucuronidele – compuși cu o polaritate evidentă, facilitînd transportul și excreția acestora.



Glucuronil transferazele sunt enzime inductibile. Imaturitatea sau deficiențele genetice ale acestor enzime duc la perturbarea proceselor de detoxifiere.

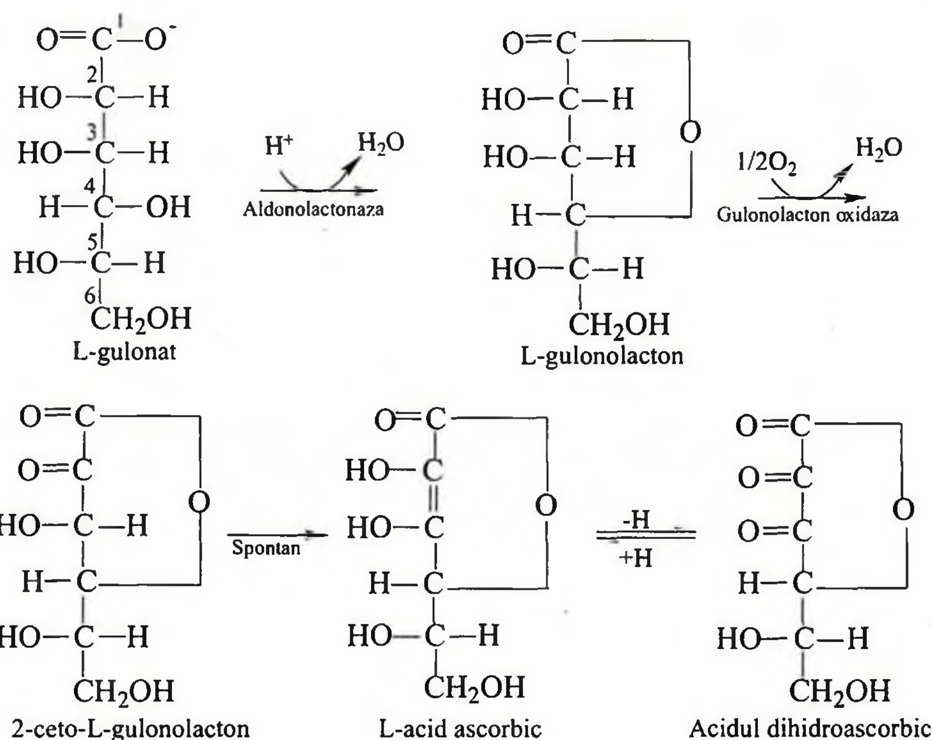
b) UDP glucuronatul este donator de glucuronil în sinteza polizaharidelor acide (proteoglicani - glicozoaminglicani).

Forma activă a acidului glucuronic poate fi hidrolizată conform reacției:

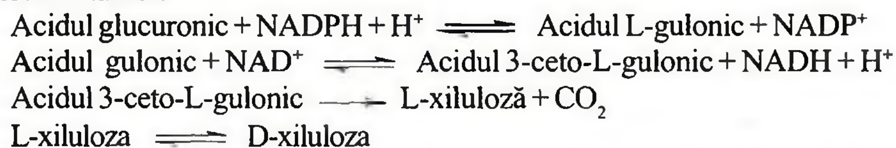


UDP-glucuronat + H_2O $\longrightarrow$ Acidul D-glucuronic + UDP

c) acidul glucuronic activat se conjugă cu hormonii tiroidieni în hipertiroidism, la un nivel scăzut de hormoni tiroidieni are loc hidroliza acestor compuși, cu eliberarea hormonilor activi.



Cînd necesitățile organismului în acid glucuronic sunt satisfăcute, metabolizarea lui conduce la D-xiluloză, substrat al HMS. Maladia ereditară, *pentozuria esențială*, se datorează imposibilității conversiei L- în D-xiluloză, ca absență a enzimei L-xilitol-dehidrogenazei NADPd, cu eliminarea în urină a L-xilulozei. Generarea L-xiluozei are loc în modul următor:



Acidul glucuronic + NADPH + H^+ $\rightleftharpoons$ Acidul L-gulonic + $NADP^+$

Acidul gulonic + NAD^+ $\rightleftharpoons$ Acidul 3-ceto-L-gulonic + NADH + H^+

Acidul 3-ceto-L-gulonic $\rightarrow$ L-xiluloză + CO_2

L-xiluloza $\rightleftharpoons$ D-xiluloza

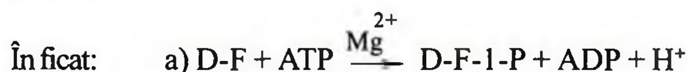
La ființe animate, cu excepția maimuțelor antropoide, cobaiului și omului, acidul L-gulonic poate fi convertit în acid ascorbic. Incapacitatea de a sintetiza ascorbatul se datorează lipsei ereditare a *gulonolacton oxidazei*.

Metabolismul fructozei

Fructoza (D-F) se conține în stare liberă în multe fructe și parvine organismului sub formă de zaharoză, la hidroliza intestinală. Este fosforilată de *hexokinază*, ce reacționează la majoritatea hexozelor:



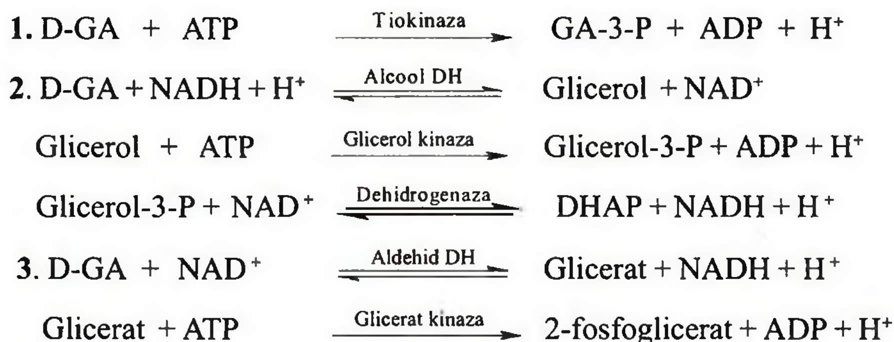
Enzima ce catalizează această reacție funcționează activ în rinichi și mușchii scheletali. Ulterior, F-6-P este convertită în G-6-P *(Glucozo-6-fosfat izomeraza)* sau în F-1,6-diP (PFK).



Enzima specifică e *fructokinaza*, apoi o aldolază scindează produsul, conform reacției:



DHAP e un produs intermediar al glicolizei, iar gliceraldehida (D-GA) poate suferi următoarele modificări:



Patologiile medicale

a) *Intoleranță ereditară la fructoză* numită și «otrăvire cu fructoză» se caracterizează prin absența aldolazei B, care conduce la acumularea intercelulară a fructozo-1-fosfat. Ultima inhibă G-6-fosfataza și glicogen fosforilaza și, prin urmare, glucoza este depozitată în ficat ca ester fosforic, ceea ce explică hipoglicemia severă, voma, icterul și hemoragia. Poate provoca insuficiență hepatică.

b) *Fructozuria* este provocată de deficiența ereditară a fructokinazei, ce conduce la acumularea fructozei în sînge. Metabolismul fructozei și dereglările respective sunt reproduse în fig. 4.12.

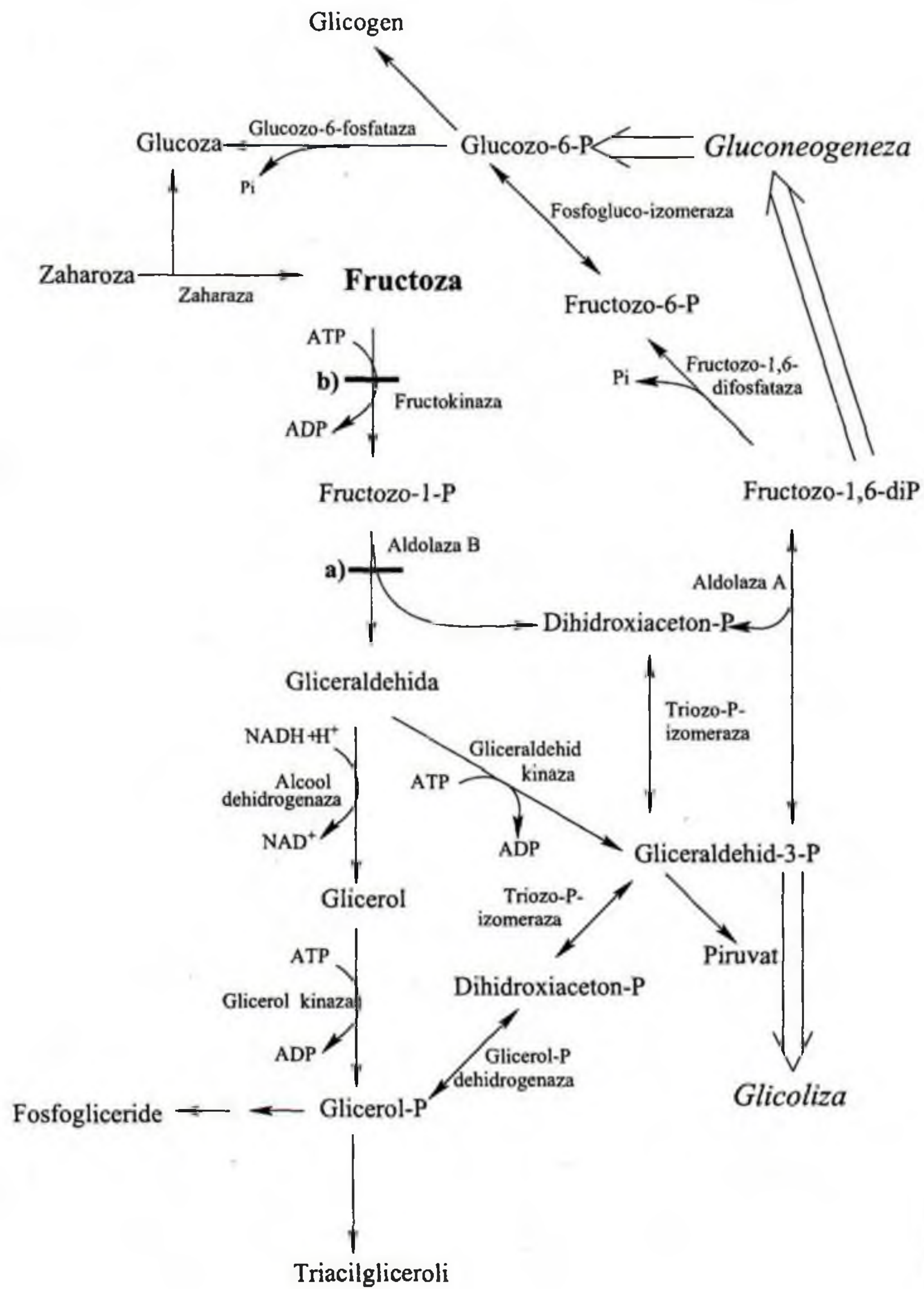


Figura 4.12. *Metabolismul fructozei*

Metabolismul galactozei

Galactoza (Gal) este component al lactozei, glicolipidelor, glicoproteinelor, proteoglicanilor. Este convertită în glucoză, cu precădere în ficat şi rinichi, de către o *hexokinază*:



1) Gal + ATP $\xrightarrow[\text{Galactokinaza}]{Mg^{2+}}$ D-Gal-1-P + ADP + H^+



2a) Gal-1-P + UDP-glucoza $\rightleftharpoons$ UDP-Gal + G-1-P

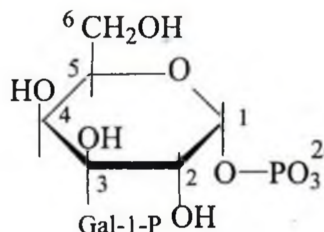
Enzima ce catalizează reacţia este *UDP-glucoza: -D-Gal-1-P uridil-transferaza.*

UDP-galactoza se formează parţial şi în urma reacţiei:



2b) Gal-1-P + UTP $\rightleftharpoons$ UDP-Gal + PP_i

Reacţia e catalizată de enzima *UDP-galactozo pirofosforilază*, activitatea ei scade, cu înaintarea în vîrstă.



Apoi are loc interconversia celor 2 oze, conform:



3) UDP-Gal $\rightleftharpoons$ UDP-glucoza

Enzima *UDP-glucozo-epimerază (Cu^{2+})* catalizează această reacţie. Echilibrul este dominat de necesităţile organismului în componentele ei. În perioadele de lactaţie, de formare a structurilor glicolipidice echilibrul e favorabil formării galactozei. Reacţia precedentă confirmă că galactoza nu e obligatorie în raţia alimentară. UDP-glucoza poate fi precursorul imediat al sintezei de glicogen.



4) UDP-glucoza + PP_i $\rightleftharpoons$ G-1-P + UTP

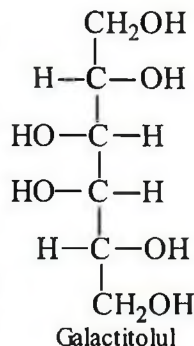
Enzima e UDP-glucozo-pirofosforilaza ce scindează UDP-glucoză la glucozo-1-fosfat, care, graţie unei mutaze (fosfogluco-mutaza), ulterior conduce la:



5) G-1-P $\rightleftharpoons$ G-6-P

Căile de utilizare a glucozei-6-fosfat sunt variate (vezi fig.4.13).

Patologiile medicale



a) La insuficienţa enzimei *UDP-α-glucoză-α-galacto-1-P-uridil-transferază* are loc acumularea în sînge a Gal-1-P. Consecinţele sunt nefavorabile pentru organism: mărirea ficatului şi a altor organe, afecţiuni ale văzului (cataractă), dereglări mentale. Modificările menţionate sunt rezultatul acumulării de Gal-1-P toxic şi a *galactitolului* – cauza directă a cataractei. Dereglările au loc mai ales la copii, de aceea, reducînd sau eliminînd complet laptele din raţie, scad simptomele patologice.

b) *Galactozemia* şi *galactouria* este provocată de deficienţa galactokinazei ce conduce la acumularea galactitolului, dacă în dietă este prezentă galactoza:

c) *Aldozreductaza* - enzimă prezentă în ficat, ţesutul nervos, veziculele seminale, nu este importantă din punct de vedere fiziologic în metabolismul galactozei, dacă nivelul galactozei nu este ridicat.

d) *Intoleranţa la lactoză* este de trei tipuri: copii prematuri (deficit congenital); deficit care apare în rezultatul îndepărtării chirurgicale a unei părţi din intestinul subţire; deficit

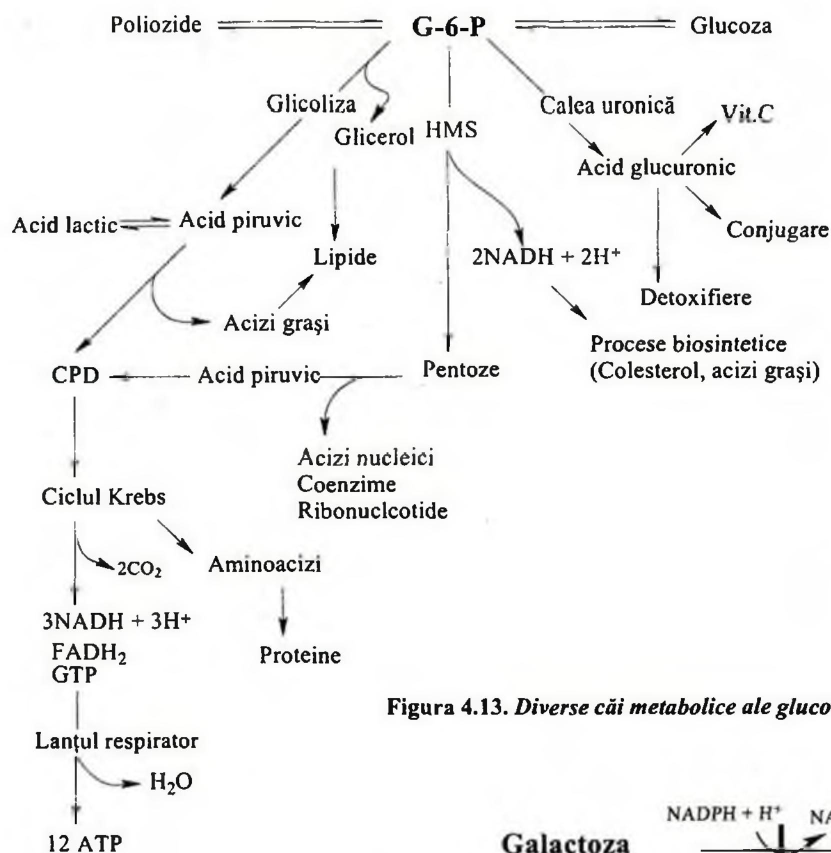


Figura 4.13. ***Diverse căi metabolice ale glucozo-6-fosfatului***

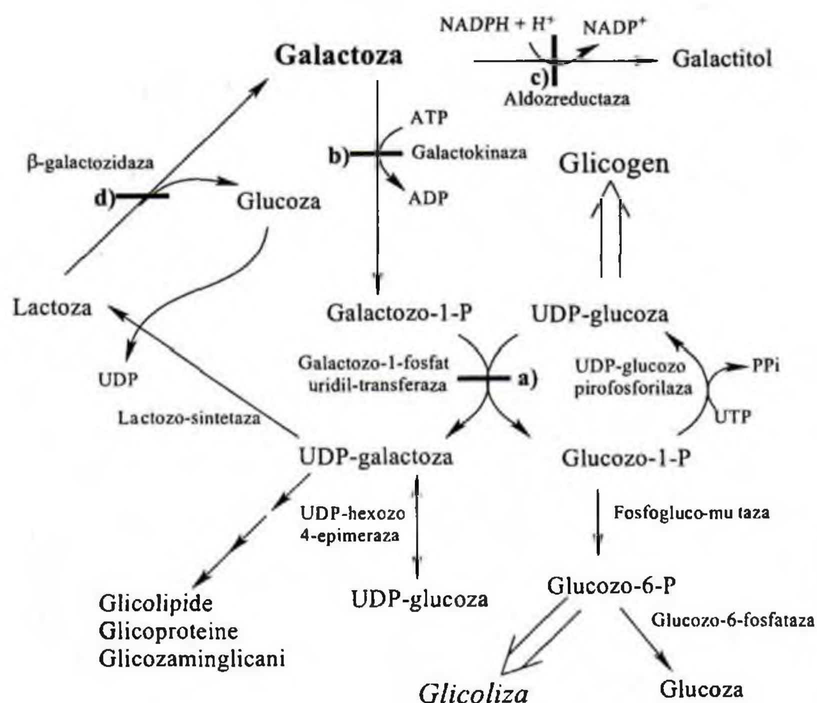


Figura 4.14. ***Metabolismul galactozei***

provocat de lezarea celulelor mucoasei intestinale. Deficitul enzimei în celulele mucoasei intestinale necesită eliminarea din dietă a sursei majore de galactoză. Organismul poate sintetiza cantitatea suficientă de UDP-Gal prin reacție de epimerizare.

Metabolismul galactozei este reprezentat în fig.4.14.

Manoza, un alt epimer al glucozei, provenită din alimentație, se utilizează în felul următor:



Enzima reprezintă o *hexokinază,* apoi o mutază va transfera manozo-6-P în fructozo-6-fosfat, intermediar al glicolizei.



O altă cale de utilizare a manozei este expusă mai jos și este necesară în sinteza glicoproteinelor, fiind precursorul GDP - fucozei:







Patologiile medicale

Deficitul enzimelor responsabile de interconversiunea monozaharidelor și de biosinteza glicoproteinelor se exprimă prin *sindromul deficienței carbohidraților* din structura glicoproteinelor. Aceste afecțiuni ereditare se manifestă prin retard de creștere, anomalii neurologice și afectare multienzimatică. Diagnosticul de laborator constă în analiza profilului electroforetic al *transferinei serice*, care migrează mai lent în absența *acidului sialic* din componența lanțurilor oligozaharidice ale proteinei. O grupă de glicoproteine ce conțin acid sialic sunt prezente în saliva oamenilor sănătoși. La pierderea acidului sialic din aceste proteine, grație unor enzime prezente în salivă, acestea precipită pe suprafața smalțului, generînd *placă dentară,* – cauza cariei și a maladiei paradontale. În condiții normale, acidul sialic nu precipită și, prin urmare glicoproteinele salivare protejează dinții de diferite afecțiuni.

Gluconeogeneza

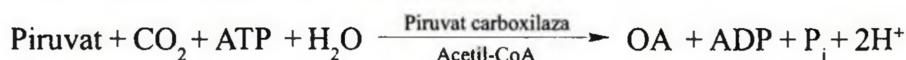
Aportul permanent al glucozei e necesar pentru funcționarea creierului, rinichilor, eritrocitelor, țesuturilor embrionului. În condițiile în care aportul nu e suficient, ca urmare a unui regim alimentar bogat în lipide, efort fizic prelungit, are loc sinteza "de novo" a glucozei din compuși neglucidici (aminoacizi, piruvat, lactat, glicerol, produse intermediare ale ciclului Krebs). Rezervele directe de glucoză asigură funcționarea normală a organismului timp de o zi (20g în sînge și 190g în glicogen). Locul preponderent al gluconeogenezei este ficatul și, mai puțin intensiv, stratul cortical al rinichilor. Parțial, gluconeogeneza este solicitată și în perioadele interprandiale, ce depășesc 8-9 ore și chiar în condițiile unui aport normal de glucoză, dar intensitatea procesului este extrem de redusă. În acest caz, ea este determinată de necesitatea reutilizării lactatului format în mușchi și eritrocite sau a glicerolului – rezultat al degradării lipidelor din țesutul adipos.

Gluconeogeneza nu este glicoliza inversată. Se ştie că glicoliza parcurge 3 etape, practic ireversibile, ce nu pot fi utilizate în gluconeogeneză. Simpla reversiune a acestor reacţii este dezavantajoasă din punct de vedere energetic, le corespunde un ΔG efectiv pozitiv. În gluconeogeneză au loc unele reacţii proprii, ce evită acest impas energetic.

Procesul presupune conversia piruvatului în glucoză prin parcurgerea în sens opus a etapelor glicolizei, cu condiţia că trei dintre ele sunt catalizate de enzime unidirecţionale.

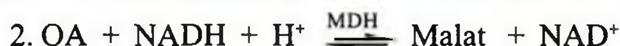
Prima reacţie este reprezentată de conversia piruvatului la fosfoenolpiruvat şi implică două sisteme enzimatice: a) mitocondrial şi b) citozolic.

a) Prima reacţie e catalizată de piruvat carboxilaza mitocondrială (biotin dependentă) ce conduce la formarea oxaloacetatului (OA):



$$\text{Piruvat} + CO_2 + ATP + H_2O \xrightarrow[\text{Acetil-CoA}]{\text{Piruvat carboxilaza}} OA + ADP + P_i + 2H^+$$

În lipsa acetil-CoA, enzima piruvat carboxilaza practic este inactivă. În continuare:



$$2.\ OA + NADH + H^+ \overset{MDH}{\rightleftharpoons} \text{Malat} + NAD^+$$

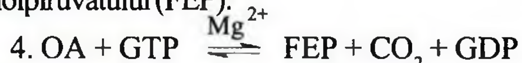
Dehidrogenaza mitocondrială e dependentă de raportul $NADH/NAD^+$.

b) Malatul părăseşte mitocondriile, prin interacţiunea unui sistem de transport al dicarboxilaţilor ce se localizează în membrana internă a mitocondriilor şi trece în citozol. Aici se reoxidează sub acţiunea malat dehidrogenazei citozolice, cu formarea oxaloacetatului:



$$3.\ \text{Malat} + NAD^+ \rightleftharpoons OA + NADH + H^+$$

Apoi, sub acţiunea fosfoenolpiruvat carboxikinazei are loc formarea fosfoenolpiruvatului (FEP):



$$4.\ OA + GTP \overset{Mg^{2+}}{\rightleftharpoons} FEP + CO_2 + GDP$$

Aşadar, conversia piruvat în FEP are loc prin utilizarea a 2 legături fosfat macroergice.

Reacţia e reversibilă. În realitate însă ΔG, în condiţiile celulare, e o mărime negativă egală cu 6,0 kcal şi, deci, reacţia în celule practic e ireversibilă. Creşterea raportului ATP/ADP favorizează reacţia de formare a FEP, reprezentînd o condiţie de desfăşurare a gluconeogenezei vizavi de necesitatea unor concentraţii mari de piruvat. Următoarele etape ale gluconeogenezei presupun conversia (parcurgerea în sens opus) reacţiilor descrise în glicoliză.



$$5.\ FEP + H_2O \rightleftharpoons 2\text{-PG}$$



$$6.\ 2\text{-PG} \rightleftharpoons 3\text{-PG}$$



$$7.\ 3\text{-PG} + ATP \rightleftharpoons 1{,}3\text{-diPG} + ADP$$



$$8.\ 1{,}3\text{-diPG} + NADH + H^+ \rightleftharpoons G\text{-}3\text{-}P + NAD^+ + P_i$$

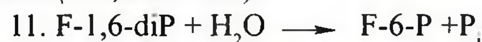


$$9.\ GA\text{-}3\text{-}P \rightleftharpoons DHAP$$



$$10.\ GA\text{-}3\text{-}P + DHAP \rightleftharpoons F\text{-}1{,}6\text{-diP}$$

Transformarea F-1,6-diP la F-6-P nu se realizează prin reversiunea reacției catalizate de PFK, ci necesită intervenția unei enzime proprii: *fructozo-1,6-difosfataza (F-1,6-diP-aza)*:

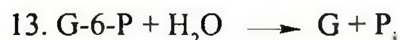


11. F-1,6-diP + H_2O $\longrightarrow$ F-6-P + P_i

Enzima este inhibată de AMP, drept modulator pozitiv servind ATP.



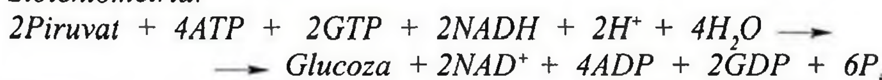
12. F-6-P $\rightleftharpoons$ G-6-P



13. G-6-P + H_2O $\longrightarrow$ G + P_i

Enzima reacției 13 glucozo-6-fosfataza e dependentă de Mg^{2+} și e localizată în reticulul endoplasmatic al ficatului. Nu se conține în creier și mușchi, de aceea aceste țesuturi nu furnizează glucoza liberă în sînge. Gluconeogeneza (GNG) necesită consumări substanțiale de energie.

Stoichiometria:

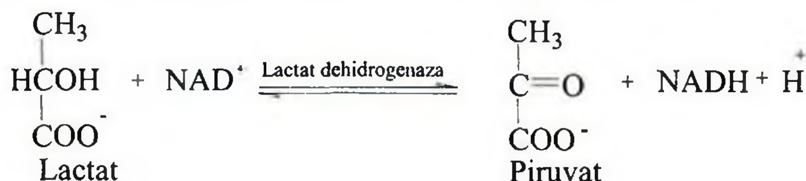


2Piruvat + 4ATP + 2GTP + 2NADH + 2H⁺ + 4H₂O $\longrightarrow$

$\longrightarrow$ *Glucoza + 2NAD⁺ + 4ADP + 2GDP + 6Pᵢ*

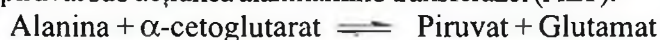
La scindarea glucozei pînă la piruvat, se formează 2 molecule de ATP, pe cînd sinteza ei necesită 6ATP + 2NADH. Aceste cantități majore se utilizează pentru asigurarea ireversibilității gluconeogenezei.

Principalele substraturi ale gluconeogenezei. Combustibilul de bază e *lactatul (50%)*, ce se formează în mușchii activi. Lactatul are impact asupra metabolismului și servește pentru transformarea ulterioară pînă la convertirea în piruvat:



Lactatul și piruvatul parcurg membranele plasmatice, difundează din mușchi în sînge și sunt transferați în ficat, unde transformarea descrisă Lactat $\longrightarrow$ Piruvat e favorizată de raportul mic $NADH/NAD^+$ în citozolul ficatului. Ciclul de interacțiuni e denumit *ciclul Cori* (fig.4.15).

Din totalitatea substraturilor gluconeogenezei 30-40% îi revine *alaninei*, aminoacid glucoformator. Alanina rezultă din degradarea proteinelor musculare și este transformată în piruvat sub acțiunea alaninamino transferazei (ALT):



Alanina + α-cetoglutarat $\rightleftharpoons$ Piruvat + Glutamat

Un substrat al gluconeogenezei este și *glicerolul*, care apare la scindarea lipidelor din adipocite:



Glicerol + ATP $\longrightarrow$ Glicerol-3-fosfat + ADP + H^+ (enzima glicerol kinaza)



Glicerol-3-fosfat + NAD^+ $\rightleftharpoons$ Dihidroxiacetonfosfat + NADH + H^+

La oxidarea acizilor grași cu număr impar de atomi de carbon, cît și la catabolismul aminoacizilor ramificați se generează propionil - CoA. Fiind convertit în malat, devine substrat al gluconeogenezei.

Reglarea gluconeogenezei. Reglarea GNG (gluconeogenezei) şi a glicolizei are loc reciproc. Este modulată activitatea enzimelor-cheie (enzime alosterice) de către anumiţi efectori metabolici.

a) Întotdeauna cînd celula acumulează mai mult acetil-CoA (mitocondrii) decît poate utiliza în cadrul ciclului Krebs, se diminuează oxidarea piruvatului ce favorizează transformările lui biosintetice în glucoză. Enzima reglatoare este piruvat carboxilaza.

b) Alt punct de reglare e reacţia catalizată de fructozo-difosfatază (inhibată de AMP). Întotdeauna cînd ciclul Krebs dispune de suficient combustibil (acetil-CoA, citrat), celula e asigurată complet cu ATP, se creează condiţii ce favorizează biosinteza glucozei din piruvat şi de stocare a glucozei în glicogen.

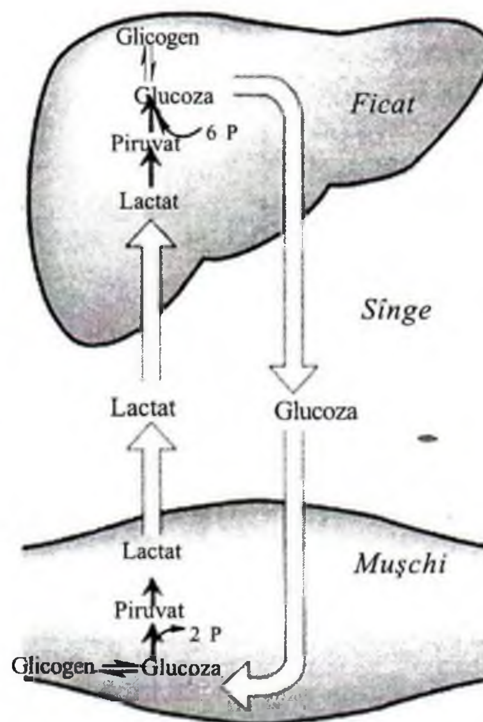


Figura 4.15. *Ciclul Cori*

c) Reglarea indirectă a procesului prin piruvat kinază, enzima glicolitică ce nu ia parte la gluconeogeneză. L-forma predomină în ţesuturile capabile de gluconeogeneză – alosteric, această izoformă se inhibă de ATP şi alanină. În condiţii de aprovizionare suficientă cu energie şi prezenţa precursorilor de glucoză, L-forma e inhibată – glicoliza încetează şi se creează o situaţie favorabilă gluconeogenezei. M-izoforma piruvat kinazei nu se reglează în aşa mod.

Produsele intermediare ale ciclului Krebs sunt precursori ai glucozei: citratul, izocitratul, α-cetoglutaratul, succinatul, fumaratul şi malatul, fiind oxidaţi, cu formarea oxaloacetatului, care, la acţiunea FEPCK, este transformat în fosfoenolpiruvat.

E important că în condiţii normale acetil-CoA nu poate fi transformat în piruvat, fapt ce confirmă că în organismele animalelor, real, nu are loc convertirea acizilor graşi cu un număr par de atomi de carbon în glucoză, fiind posibilă doar la oxidarea celor impari.

Majoritatea aminoacizilor sunt glucogeni, fiind respectiv transformaţi în substraturi ale ciclului Krebs, care se pot converti direct în glucoză şi glicogen. Dau piruvat: ala, ser, gly, cys; α-cetoglutarat: glu, gln, pro, arg, his; succinil-CoA: val, thr, met; oxaloacetat: asp, asn. O parte din atomii de C ai phe, trp, ile, lys, tyr participă la sinteza glucozei, alţii – la sinteza corpilor cetonici. Realmente, numai leucina (leu) nu e capabilă să dea atomul de carbon pentru sinteza glucozei.

Foarte intensiv are loc gluconeogeneza în perioada de restabilire după efortul fizic, ce solicită mult O_2 pentru sinteza ATP, necesar sintezei glucozei şi a glicogenului. Un loc deosebit ca precursor îl are alanina. S-a demonstrat că viteza sintezei glucozei

din alanină este mai mare decît a oricărui alt aminoacid. Sursa esențială a alaninei este mușchiul, unde ea rezultă din sinteza piruvatului, consecința glicolizei și a convertirii unor aminoacizi. S-a subliniat mai sus că ea intervine în reglarea activității piruvat kinazei hepatice, blocînd conversia fosfoenolpiruvatului la piruvat, favorizînd în consecință utilizarea precursorilor glucozei în gluconeogeneză.

Patologiile medicale

Fluxul metabolic la nivelul gluconeogenezei este mult amplificat la pacienții cu diabet zaharat, contribuind la apariția și menținerea *hiperglicemiei.*

Gluconeogeneza poate deveni insuficientă în caz de *hiperproducție de acid lactic,* de exemplu în hipoxia prelungită sau în anomalii ale lanțului respirator mitocondrial (*citopatii mitocondriale*). Ca urmare, se instalează *acidoza lactică* manifestată prin tulburări neurologice, digestive și musculare.

Diminuarea ratei gluconeogenezei se caracterizează prin hipoglicemie și acidoză lactică (prin reducerea conversiei lactatului la piruvat).

Consumul de alcool produce cantități mari de NADH + H^+, prin oxidarea etanolului la acetaldehidă, sub acțiunea alcool dehidrogenazei. În aceste condiții piruvatul este redus la lactat, nemaifiind disponibil pentru inițierea gluconeogenezei. Acetaldehida inhibă fosforilarea oxidativă.

Deficitul ereditar al enzimelor gluconeogenezei se manifestă prin apariția hipoglicemiei în perioadele interalimentare. Deficiența ereditară a *fructozo- 1,6-difosfatazei,* ce se trasmite autosomal recisiv, este cauza hipoglicemiei, cetozei și acidozei lactice severe. Deficitul de *glucozo-6-fosfatază,* enzimă comună gluconeogenezei și glicogenolizei, este responsabil de glicogenoza de tip I (*boala von Gierke*). Acumularea de glucozo-6-fosfat determină, la rîndul său, acumularea de glicogen în ficat și rinichi, precum și activarea excesivă a căii pentozo-fosfat, cu producerea masivă de ribozo-5-fosfat și, implicit, de nucleotide purinice. Amplificarea catabolismului purinelor se manifestă prin hiperuricemie.

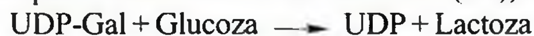
Procesul de sinteză și reglare a lactozei

Enzima catalizatoare este l*actozo-sintetaza* constituită din subunitatea catalitică și cea modificatoare.

Subunitatea catalitică (G), *galactozil-transferaza,* e activă în transferul enzimatic al galactozei de la UDP-galactoză la N-acetilglucozamin, cu sinteza N-acetillactozamin.


UDP-Gal + N-acetilglucozamin ⟶ UDP + N-acetillactozamin.

Specificitatea se modifică la asocierea cu subunitatea-M (*α-lactalbumin*). Complexul e denumit *lactozo-sintetază* (LS), ce transferă galactoza activă pe glucoză.


UDP-Gal + Glucoza ⟶ UDP + Lactoza

Lactozo-sintetaza se profilează în glanda mamară, iar *galactozil-transferaza* – în majoritatea țesuturilor, unde catalizează sinteza componentului glucidic al glicoproteinelor. În graviditate, galactozil transferaza se sintetizează și se acumulează în glanda mamară, pe cînd subunitatea M se sintetizează în cantități mici. Schimbările spontane în conținutul unor hormoni produc și sinteza subunității M în cantități mari. Complexul va sintetiza multă lactoză. E un argument ce confirmă că hormonii își au efectul lor prin modificări rapide ale specificității enzimelor.

Reglarea nivelului de glucoză în sînge. Reglarea hormonală

Sunt identificate două grupe de hormoni: una favorizează depozitarea şi alta – utilizarea de energie. Un rol unic îi aparţine *insulinei*, hormon ce facilitează depozitarea tuturor tipurilor de bază ale substanţelor energetice. *Adrenalina, glucagonul, cortizonul, tiroxina, somatotropina* accelerează utilizarea de energie, conform următoarelor mecanisme:

1. Glucagonul amplifică glicogenoliza şi gluconeogeneza.
2. Catecolaminele favorizează glicogenoliza şi blochează absorbţia glucozei.
3. Cortizonul facilitează gluconeogeneza şi blochează absorbţia glucozei.
4. Somatotropina inhibă absorbţia glucozei.

Insulina este unicul hormon, secreţia căruia e dependentă de nivelul glucozei sanguine, ce provoacă micşorarea concentraţiei zahărului. Ceilalţi hormoni enumeraţi mai sus măresc nivelul glucozei şi necesită ca excitanţi o hipoglicemie vădită sau intercalarea semnalelor de tipul stresului, raţiei proteice, efortului fizic etc. Aceşti hormoni sunt denumiţi anti-reglatori, spre deosebire de insulină, denumită reglatorul esenţial.

Insulina

În 1921, F.Banting şi C.Best au publicat datele referitoare la injectarea extrasului din pancreas, după 6-8 săptămîni de la ligamentul ductului respectiv. S-a constatat că dispare hiperglicemia şi glucozuria la animalele cu diabet. În 1926, substanţa în cauză e cristalizată şi numită *insulină* (Abel). Unele etape-cheie în studiul insulinei: în 1953, F.Sanger determină secvenţa aminoacizilor în proteină – insulina, şi numai în 1965, P. KatsoYannis a realizat sinteza chimică a insulinei. În 1967, D.Steiner a depistat proinsulina, iar peste doi ani a fost stabilită şi structura ei tridimensională.

Molecula acestui hormon e compusă din 2 lanţuri peptidice (α şi β), unite prin două punţi disulfidice. Elocventă e şi puntea între al 6-lea şi al 11-lea aminoacid din catenă. Insulina conţine 51 aminoacizi şi are o masă moleculară egală cu 5800 Da. Punctul izoelectric = 5,35. În clinică e utilizat hormonul bovinelor şi al porcinelor (bovinele conţin alanină în loc de treonină, la capătul terminal C în lanţ; porcinele – alanina în locul tirozinei 8 şi valina în locul izoleucinei 10).

La oxidarea lanţurilor polipeptidice sau reducerea punţilor disulfidice, insulina îşi pierde activitatea biologică. Insulina cristalică (porcină) e un hexamer (3 dimere în jurul axei centrale cu 2 atomi de Zn – în preparate se conţin 0,4-0,5% de Zn).

La pierderea asparaginei de la capătul C terminal α lanţ şi alaninei din β lanţ, activitatea hormonală se reduce cu 95%. Se consideră că fragmentul 22-26 al aminoacizlor în β lanţ participă la legarea insulinei cu receptorul şi activitatea lui, în ansamblu.

Biosinteza. Primar, e sintetizat un polipeptid major numit preproinsulină şi apare peste cîteva minute după sinteză. El este scindat de proteazele microzomiale la proinsulină (pierde 23 resturi de aminoacid de la capătul N-terminal). Proinsulina reprezintă o moleculă spiralizată, α şi β lanţuri sunt unite prin C fragment (26-30AA) (fig. 4.16).

Proinsulina posedă o rată de 3-5% din activitatea biologică.Sinteza are loc în polizomii reticului endoplasmatic. Proinsulina este transferată într-un proces energodependent în complexul Golgi, unde e împachetată şi păstrată în granule secretorii, fiind aici scindată, în cantităţi echimolare, în insulină şi C-peptidă. Insulina şi zincul se acumulează în zonele

centrale ale granulei. Mişcarea spre membrana plasmatică e determinată de microfilamente (tubulină şi actină). Insulina şi C-peptida sunt expulzate în exterior, contracţia fiind dependentă de ionii de Ca^{2+}.

Ce factori determină secreţia insulinei?

Concentraţia insulinei este egală cu 5-20 µU/mL sau 35-145 pmol/L. Factorul primordial e glucoza. Teoria metabolică confirmă că:

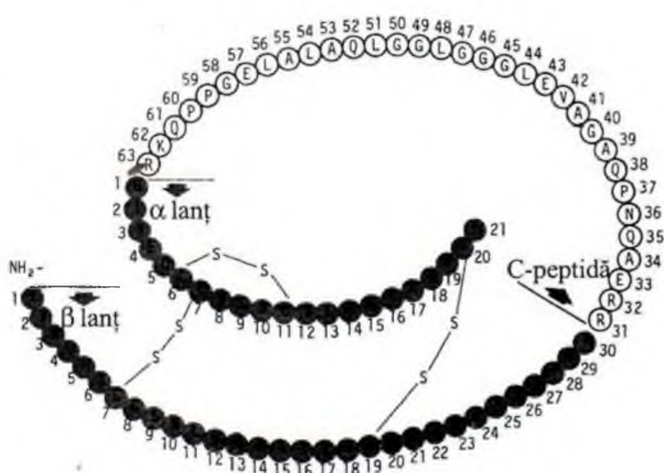


Figura 4.16. ***Structura primară a proinsulinei la om***

a) glucidele metabolizate sunt stimulatori mai efectivi decît cei nemetabolizaţi (manoza);

b) glucoza măreşte concentraţia intermediaţilor glicolizei în beta celule;

c) substanţele inhibitoare ale metabolismului glucozei previn secreţia insulinei.

O altă concepţie este fondată pe interacţiunea glucozei cu receptorul specific care se modifică, favorizînd secreţia insulinei.

Succesiunea fenomenelor poate fi reflectată astfel: transferul glucozei în celule activează glicoliza, rezultă sporirea nivelului de NADH şi NADPH, conţinutului de AMPc. Aceste modificări favorizează creşterea concentraţiei de Ca^{++}, care accelerează eliminarea insulinei.

Reacţia de eliminare a insulinei de glucoză e fazică. În prima fază are loc creşterea rapidă a secreţiei la un minut după administrarea glucozei, devenind maximă în următoarele 2 minute şi revenind la normal la 5 minute. În a doua fază se observă o creştere lentă, începînd cu a 5-10' după infuzie, la continuarea acesteia timp de o oră. Inhibitorii sintezei proteice micşorează intensitatea acestei faze. Prima e cauzată de eliminarea insulinei depozitate, a doua – insulina e sintetizată cu cantităţi mici de proinsulină. E cert faptul că glucoza stimulează sinteza insulinei la nivelul posttranscripţional.

Investigaţiile efectuate au stabilit că reacţia insulinei din plasmă la testul peroral cu glucoză e de două ori mai mare decît reacţia la testul intravenos. Aici este evidenţiat rolul tractului gastrointestinal, prin interacţiunea următoare: la absorbţia şi transportul lor în sistemul circulant se produce eliberarea hormonilor locali ca: *gastrina, secretina, colecistokinina, polipeptida intestinală activă, polipeptida gastrică de inhibiţie*. O deosebită valoare o are şi influenţa semnalelor neurogene determinate de nutriţie.

S-a stabilit că aminoacizii administraţi *per os* stimulează secreţia mai intensivă a insulinei, decît infuzia lor intravenos. Efectul e cauzat de secreţia gastrinei. Analogii nemetabolizaţi ai argininei şi leucinei menţin capacitatea de stimulare a secreţiei insulinei. Posibil ca triger al secreţiei insulinei poate servi identificarea membranară, dar nu metabolismul intracelular al aminoacizilor.

Reglarea secreției insulinei

Adrenalina inhibă secreția insulinei dependente de glucoză (prima fază), modificînd atît nivelul intracelular al AMPc, cît și toleranța la glucoză, la fel ca și efectele insulinei, în final.

Stimularea sistemului parasimpatic (SPS) mărește nivelul insulinei, iar stimularea nucleelor hipotalamice ventromediale inhibă secreția insulinei. *Serotonina* stimulează secreția insulinei, *DOPA* - inhibă. *Somatostatina* inhibă secreția hormonilor pancreatici, suprimînd, posibil, și eliminarea hormonilor gastrointestinali.

Efectul insulinei. S-a constatat că e accelerat transferul glucozei în celulă. În 1989, s-a stabilit gena ce codifică proteina – transportatorul glucozei. Proteina e receptivă la insulină, deplasîndu-se din interiorul celulei (microzomi) spre membrana plasmatică. Există mai multe proteine de acest fel, fiind studiate și genele lor. Genele au secvențe nucleotidice identice ca și în DNA a omului. Se crede că defectul înnăscut al proteinei-transportator determină predispoziția spre diabet (fig. 4.17).

Nivelul glucozei sanguine oscilează nu mai mult decît cu 30-40mg/100mL sau 1,5-1,7 mmol/L. Reglarea fină e stabilită de sensibilitatea ficatului la insulină. Sporirea glucozei cu (0,5 -0,6mmol) 10-15 mg/100mL cauzează, respectiv, și sporirea insulinei la 60-100%.

Organul-țintă de bază e ficatul. După trei ore de la administrarea a 100g glucoză, 60% sunt absorbite de ficat și sunt utilizate la sinteza glicogenului și a lipidelor. Și numai 15% din doză e utilizată la periferia dependentă de insulină, extra ficat.

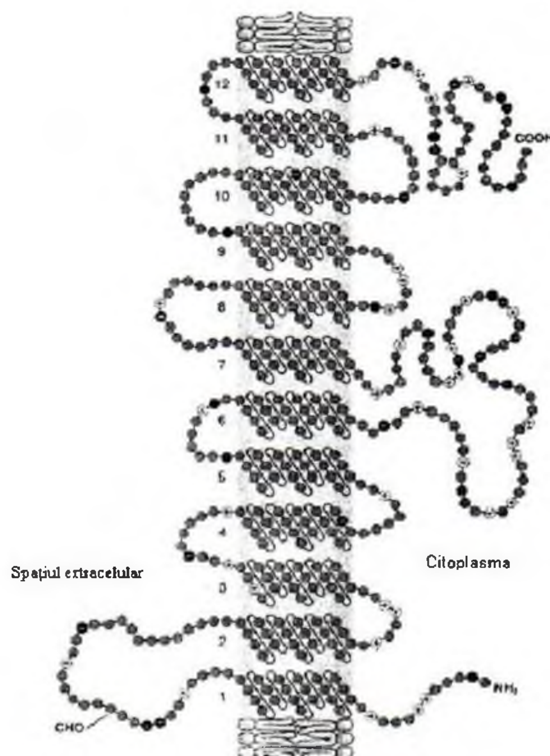


Figura 4.17. ***Structura transportatorului de glucoză — o proteină unicatenară din 492 aminoacizi ce formează 12 segmente organizate în membrană; aminoacizii hidrofili sunt situați extramembranar***

Influența insulinei asupra metabolismului ficatului se caracterizează prin:

- activarea glucokinazei care crește în raport direct cu insulina și rația saturată de glucide: la 180 (8mmol) mg/100mL. Chiar și în asemenea condiții activitatea ei e saturată numai la 1/2;
- accelerarea activității fosfofructo kinazei;
- intensificarea activității glicogen sintazei;

- inhibarea glicogen fosforilazei;
- suprimă, de altfel, şi gluconeogeneza, inhibînd fosfoenolpiruvat carboxikinaza;
- diminuează activitatea piruvat carboxilazei;
- micşorează nivelul glucozei în sînge, prin activarea transportatorului ei în ţesut.

Efectul insulinei la metabolismul ţesutului adipos e dependent de:
- intensificarea transportului glucozei prin membrana celulară;
- produsele metabolismului final al glucozei sunt acizii graşi, α-glicerolfosfatul - ultimul serveşte la sinteza lipidelor în ficat.

Insulina amplifică rezervele proteice ale organismului prin următoarele mecanisme:
- sporeşte absorbţia aminoacizilor în ţesuturi;
- stimulează sinteza proteinelor;
- inhibă catabolismul proteinelor;
- micşorează viteza oxidării aminoacizilor.

Metabolismul lipidic e dependent de insulina care:
- stimuleaza inițial activitatea acetil-CoA-carboxilazei, apoi grăsimile sintetizate sunt transportate în depou;
- micşorează aportul acizilor graşi liberi, reduce efectul lor inhibitor asupra acetil-CoA-carboxilazei;
- amplifică absorbţia de ţesut adipos al lipidelor, prin stimularea activităţii lipoproteidlipazei;
- este un inhibitor puternic al triglicerid lipazei – enzimă hormonodependentă;
- diminuează capacitatea ficatului de a oxida acizii graşi, indiferent de cantitatea lor – efect anticetogenic, cauzat de diminuarea nivelului de carnitină, cu mărirea indicelui de malonil-CoA. Efectul se observă şi în muşchi – interacționînd, se amplifică;
- stimulează sinteza acizilor graşi în finalul efectului;
- majorează utilizarea glucozei pe calea pentozofosfatică, mărind cantitatea de NADPH necesar pentru sinteza acizilor graşi.

Realizarea efectului – mecanismul de acțiune

Prima etapă, la fel ca şi la ceilalți hormoni de natură peptidică, include fixarea ei de receptorul specific pe membrana plasmatică a celulei.

Receptorul insulinic este un tetramer format din patru subunități identice, două cîte două (α şi β), unite între ele prin punți disulfidice(vezi fig.4.18). Subunitățile α sunt dispuse extracelular şi conțin situsul de legare al insulinei. Subunitățile β sunt dispuse transmembranar şi intracelular. Receptorul este în acelaşi timp o proteină cu activitate tirozinkinazică, domeniul intracelular al subunităților β fiind fosforilat la nivelul resturilor de tirozină, ca urmare a legării insulinei. Această autofosforilare conduce la activarea receptorului, imediat după legarea insulinei şi în prezența ATP ca donator de energie şi de fosfat.

Receptorul fosforilat inițiază o serie de reacții intracelulare, care constituie transducția semnalului pînă la nivelul efectorilor celulari specifici. El exercită o activitate kinazică la IRS-1, primul substrat al receptorului pentru insulină, care este activat prin fosforilare şi transformat în IRS-1-P. Apoi, IRS-1-P fosforilează o proteinkinază, care declanşează o cascadă de fosforilări şi la alte proteinkinaze citoplasmatice. Această succesiune de

fosforilări are ca scop amplificarea semnalului hormonal, deoarece fiecare moleculă activată acționează asupra mai multor molecule-țintă, activîndu-le, la rîndul său. Ultima fosforilare activează proteinfosfatazele specifice, care hidrolizează formele inactive, fosforilate ale unor enzime, eliberînd formele active, *defosforilate:* glicogen sintetaza, piruvat kinaza, complexul multienzimatic al piruvat dehidrogenazei, acetil-CoA carboxilaza,HMG-CoA reductaza. Enzimele activate intervin ca enzime-cheie în reglarea unor căi metabolice majore. Efectele insulinei în interiorul nucleului constau în activarea unor factori de transcriere, care induc exprimarea genelor ce codifică transportatorii sau enzimele-cheie în reglarea metabolismului. Genele, a căror exprimare este indusă de către insulină, codifică următoarele proteine:

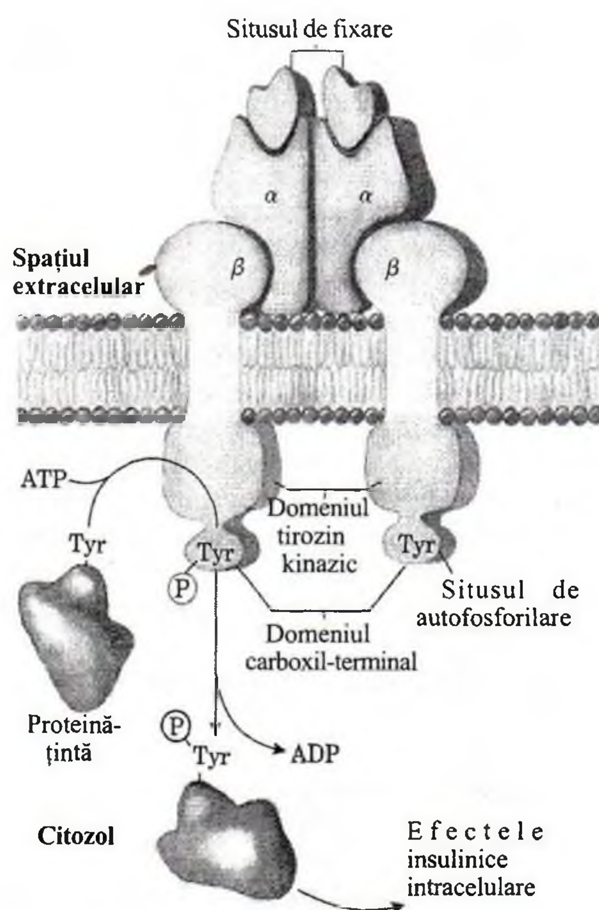


Figura 4.18. Receptorul insulinic
Receptorul insulinic constă din 2 lanțuri pe partea externă a membranei plasmatice și 2 lanțuri ce traverseaza membrana și ies afară din faza citozolică. Legarea insulinei de lanțurile α determină o schimbare conformațională ce permite autofosforilarea restului Tyr în domeniul carboxil-terminal al subunităților. Autofosforilarea activează mai departe domeniul tirozinkinazei, care mai apoi catalizează fosforilarea altor proteine-țintă

a) transportatorii pentru glucoză, $GluT_4$;

b) glucokinaza care transformă glucoza în glucozo-6-fosfat, formă activă din punct de vedere metabolic;

c) piruvat kinaza și fosfofructo kinaza 1, enzime alosterice esențiale în reglarea glicolizei;

d) lipoproteidlipaza, enzimă-cheie în reglarea metabolismului lipidic.

Calea de semnalizare prin insulină reglează expresia genei specifice, implică o cascadă de proteinkinaze, fiecare activînd-o pe cealaltă. Receptorul insulinic este o kinază Tyr-specifică; celelalte kinaze fosforilează resturile Ser sau Thr. MEK este o kinază bi-specifică, ce fosforilează atît Thr ca și Tyr în MAPK. MAPK este uneori denumit ERK (kinază reglată extracelular). MEK este mitogen-activată, ERK-kinaza activatoare, SRF este factorul seric de răspuns. Semnalizarea prin receptorul insulinic este reprezentată în figura 4.19.

Grb2 nu este singura proteină activată prin asocierea cu IRS-1 fosforilat. PI-3 kinaza (PI-3K) se asociază cu IRS-1 prin domeniul SH_2 (fig.4.20). Activată, PI-3K transformă fosfatidilinozitolul lipidic membranar 4,5-bifosfatul, numit şi PIP_2, în fosfatidil-inozitol 3,4,5-trifosfat (PIP_3), care indirect activează o altă kinază, proteinkinaza B (PKB). La legarea cu PIP_3, PKB este fosforilat şi activat de o altă proteinkinază, PDK1.

PKB fosforilează apoi resturile Ser sau Thr la proteinele-ţintă, una dintre care este glicogen sintazkinaza 3 (GSK3). În forma sa activă, nonfosforilată, GSK3 fosforilează glicogen sintaza, inactivînd-o şi, în consecinţă, încetinind sinteza de glicogen. După ce este fosforilată de PKB, GSK3 este inactivată. Astfel, prevenindu-se inactivarea glicogen sintazei, cascada protein-fosforilarii iniţiată de insulină stimuleaza sinteza glicogenului (fig.4.20).

Se crede că şi PKB determină mişcarea transportatorilor de glucoză ($GluT_4$) din veziculele interne la membrana plasmatică, stimulînd aportul glucozei în sînge.

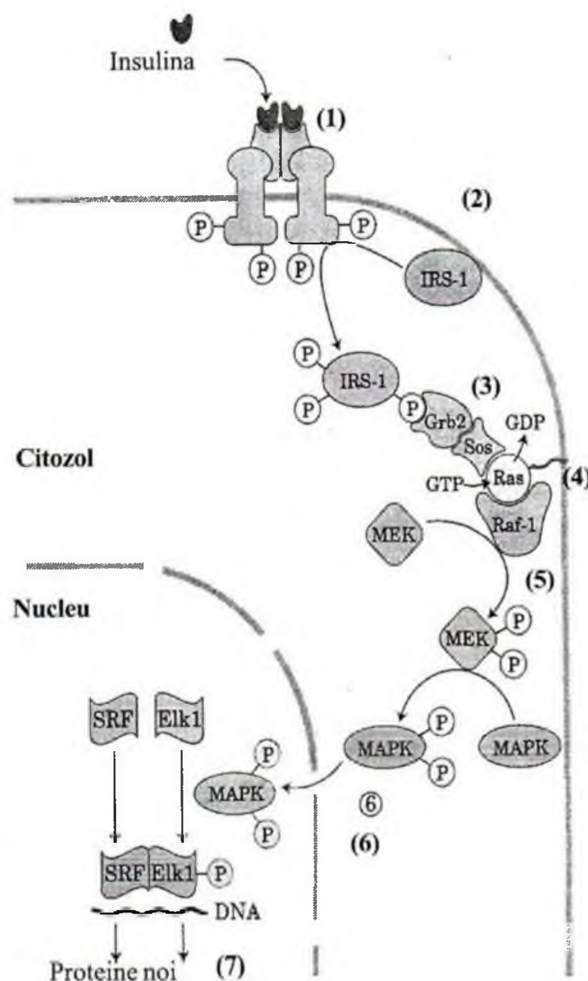


Figura 4.19. Reglarea expresiei genei prin insulină
1.Receptorul insulinic leagă insulina şi determină autofosforilarea la restul Tyr carboxil terminal.
2.Receptorul insulinic fosforileaza IRS-1 al Tyr.
3.Domeniul SH_2 al lui Grb2 se leagă la P-Tyr al IRS-1. Sos se leagă la Grb2, apoi la Ras, cauzînd eliberarea GDP si legarea lui GTP la Ras.
4.Ras activat se leagă şi activează Raf-1.
5.Raf-1 fosforilează MEK la 2 Ser, activindu-l. MEK fosforilează MAPK la Thr şi Tyr, activindu-l.
6.MAPK se deplasează la nucleu şi fosforilează factorii de transcripţie nucleari precum ELK-1, activîndu-i.
7.ELK-1 fosforilat se alatură la SRF pentru a stimula transcripţia unui set de gene necesare pentru diviziunea celulară

Prin ce se determină evoluţia unui asemenea sistem complicat de reglare?

Sistemul permite unui singur receptor activat să activeze mai multe molecule IRS-1, amplificînd semnalul insulinic, şi permite integrarea mai multor semnale la mai mulţi

receptori, fiecare capabil să fosforileze IRS-1.

În continuare, IRS-1 poate activa oricare dintre proteinele ce conțin domenii SH_2. Un singur receptor ce actionează prin IRS-1 poate semnaliza pe două sau mai multe căi: insulina reglează expresia genelor prin calea Grb2-Sos-Ras-MAPK și activează metabolismul glicogenului, prin calea PI-3K-PKB.

Receptorul insulinic este un prototip pentru un numar de enzime receptoare ce au structură similară și activitate proteintirozin kinazică. Receptorii pentru *factorul de creștere epidermal* și pentru *factorul de crestere al plachetelor* au, spre exemplu, similitudini structurale și secvenționale cu receptorul insulinic și ambele au activitate protein tirozin kinazică ce fosforilează IRS-1. Mulți dintre acești receptori dimerizează ligandul de legatură; receptorul insulinic este deja un dimer înainte de legarea insulinei.

În adiție la multitudinea de receptori ce se comportă ca protein tirozin kinaze, un numar de receptori precum proteinele membranare plasmatice au activitate de protein-tirozin fosfatază. Bazîndu-ne pe aceste structuri proteice, putem presupune că liganzii lor sunt componente ale matricei extracelulare a suprafețelor celulare. Deși rolul lor semnalizator nu este înca deplin cunoscut, la fel ca cel al receptorului tirozin kinazic, la sigur, au posibilitatea să inverseze acțiunea semnalelor ce stimulează aceste kinaze.

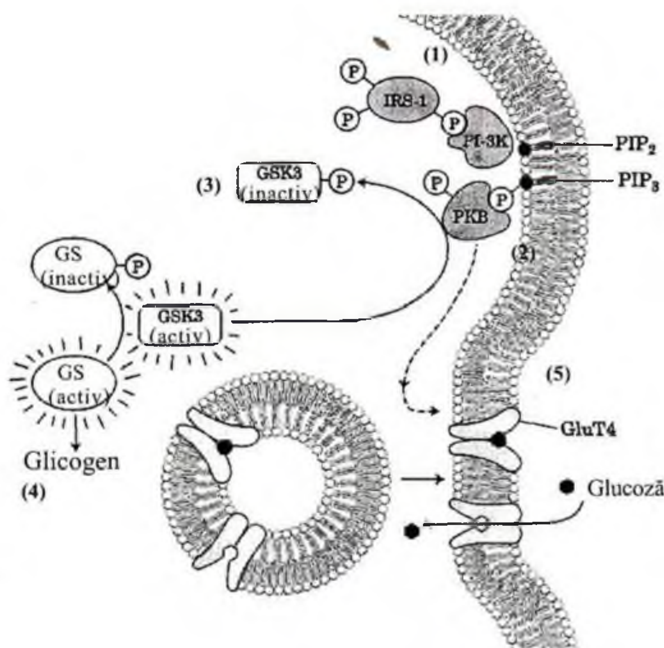


Figura 4.20. Activarea glicogen sintazei de insulină
Transmiterea semnalului este mediată de PI-3 kinază (PI-3K) si proteinkinaza B (PKB).
1. IRS-1, fosforilat de către insulin-receptorul, activează PI-3K prin legarea la domeniul SH_2, PI-3K transformă PIP_2 în PIP_3.
2. PKB se leagă la PIP_3 și e fosforilat de PSK-1 (nu e prezentat). Deși activat, PKB fosforilează GSK3 la Ser, inactivindu-l.
3. GSK3, inactivat prin fosforilare, nu poate transforma glicogen sintaza (GS) în forma sa inactivă prin fosforilare, așa că GS ramîne activată.
4. Sinteza de glicogen din glucoză este accelerată.
5. PKB stimulează mișcarea transportatorului glucozei $GluT_4$ din veziculele interne membranare la membrana plasmatică, sporind aportul de glucoză

Efectul hormonal e în funcție de numărul de receptori ce-l leagă (de la 50 mii în adipocite și pînă la 250 mii în hepatocite). Efectul maxim se observă la fixarea a mai puțin de 10% din cantitatea totală. Sensul funcțional al rezervei constă în condițiile de micșorare a numărului de receptori (de exemplu, obezitate). La o mărire adecvată a concentrației

de insulină, numărul de complexe hormono-receptoare atinge mărimea critică necesară pentru inițierea reacției biologice. O proprietate a receptorilor constă în faptul că numărul lor e reglat de concentrațiile insulinei. Această particularitate stă la baza patogeniei stărilor insulino-rezistente, situațiilor cu sensibilitate mărită față de insulină. Stările insulino-rezistente, însă, pot fi cauzate şi de mecanismele provocate de tulburări la nivelul postreceptoric intracelular.

Evident, după fixarea cu receptorii, complexul hormono-receptor este internat în celulă şi metabolizat în lizozomi. Nu e clar dacă acest proces ar avea o anumită influență asupra metabolismului celular. O ipoteză alternativă ar putea fi acțiunea unui mesager secundar, omologul lui AMPc, determinat de efectul hormon-receptor. Natura lui nu e stabilită.

Efectul biologic e în funcție de perioada de înjumătățire a insulinei, egală aproximativ cu 4-5 minute şi circa 40-50% de insulină e metabolizată în ficat. Activitatea insulino-degradantă o are *glutation-transhidrogenaza* (scindează punțile S-S, eliberînd catene inactive). Insulina este metabolizată şi de enzima proteaza ce scindează legăturile peptidice. În rinichi se inactivează 15-20% din insulina totală.

Sinteza insulinei şi secreția ei e reglată, probabil, şi de sistemul nervos. S-a confirmat că pe suprafața membranelor celulelor este situată o proteină (masa moleculară egală cu 64000 Da), țintă pentru celulele autoimune patologice. Proteina e o enzimă-*glutamat decarboxilază*, ce elimină CO_2 din glutamat, cu formarea acidului γ-aminobutiric (GABA) – situație caracteristică pentru diabetul de natură autoimună, dependent de insulină.

Patologiile medicale

Insulinorezistența periferică constituie un sindrom biochimic caracterizat prin creşterea marcată a sintezei de insulină în pofida unui nivel normal al glicemiei. Acest fapt se datorează unor mutații ale genei care codifică receptorul de insulină, cauzînd imposibilitatea transmiterii intracelulare a mesajului hormonal. În această categorie de afecțiuni se includ diverse boli ereditare, cum ar fi: *diabetul lipoatrofic infantil*, anumite forme de obezitate, *sindromul Donahue* (dismorfism facial, caşexie, retard mental, hipotrofie staturală) sau diverse tulburări endocrine.

Mutațiile descrise la nivelul genei pentru insulină se manifestă prin insulinorezistență în măsura în care este afectată recunoaşterea insulinei de către receptorul său specific. O mutație la nivelul situsului de scindare a precursorului insulinei generează creşterea marcată a proinsulinei în circulație, în detrimentul insulinei active.

Diabetul zaharat constituie o afecțiune metabolică şi endocrină manifestată prin hiperglicemie persistentă, asociată în timp cu complicații acute (cetoacidoză diabetică, comă diabetică) sau cronice (angiopatia diabetică, retinopatia diabetică, nefropatia diabetică).

Se descriu mai multe tipuri de diabet zaharat:

a) *Diabetul insulinodependent (tip 1)* este cauzat de deficitul insulinei, consecința unor mecanisme autoimune (prezența anticorpilor anticelulei β a insulelor Langerhans); boala debutează timpuriu şi se manifestă prin deficitul total al insulinei, concomitent cu degenerarea marcată a celulelor β pancreatice.

b) *Diabetul non-insulinodependent (tip 2)* este o afecţiune multifactorială, relativ frecventă. Boala este cauzată de deficitul de insulină, asociat frecvent cu obezitatea, insulinorezistenţa periferică şi perturbarea metabolismului lipidic.

c) *Diabetul de tip MODY-2* este o afecţiune ereditară monogenică, provocată de deficitul *glucokinazei*; ca urmare, se observă diminuarea glicolizei şi a glicogenogenezei în ficat, ceea ce determină activarea reacţională a gluconeogenezei.

d) *Diabetul zaharat secundar* se desemnează în pancreatitele cronice sau în alte afecţiuni care lezează integritatea funcţională a pancreasului.

e) *Diabetul secundar cu exces de hormoni* hiperglicemianţi se întîlneşte în bolile endocrine caracterizate prin hipersecreţia de catecolamine (feocromocitom), cortizol (sindromul Cushing) sau somatotropina (gigantism, acromegalie). Aceste sindroame sunt însoţite de insulinorezistenţă periferică.

g) *Diabetul gestaţional* debutează pe parcursul sarcinii şi poate evolua spre instalarea diabetului zaharat, reducerea toleranţei la glucoză sau spre restabilirea homeostaziei glucidice anterioare.

Glucagonul

La toate speciile de mamifere acest hormon prezintă un polipeptid unicatenar (29 aminoacizi). Capătul N-terminal e necesar pentru fixare şi activitate celulară. Glucagonul este sintetizat în α-celule.

Stimulatori ai secreţiei hormonale sunt raţia proteică, infuzia de aminoacizi, efortul fizic. Inhibă secreţia lui glucoza, somatostatina.

Acţiunea lui reprezentativă e stimularea glicogenolizei, gluconeogenezei şi cetogenezei. În ficat joacă rolul de reglator al glicemiei în asimilarea proteinelor (preponderent, produselor animale – carnea). Glucagonul se inactivează primordial în rinichi. E indiscutabil faptul că homeostazia glucidelor e reglată de relaţia insulină-glucagon (fig.4.21).

Studiul metabolismului glucidic

Un rol esenţial îl au metodele de dozare cantitativă a glucozei. Cea mai răspîndită e metoda cu aplicarea ortotoluidinei (reactiv cromogen), în care grupele aldo- şi ceto ale hexozelor formează, cu aminele aromatice, compuşi coloraţi.

În cazurile în care se suspectează diabetul, se provoacă *o hiperglicemie*. Proba I: se recoltează sîngele pînă la încărcarea cu glucoză (dimineaţa, după 10-14 ore de foame). Se ia glucoza – 100-50g (mai bine 1g/kg greutate) şi se dizolvă în 250 mL de apă. Observăm evoluarea glicemiei la interval de 30 minute (probele II, III, IV). În mod normal, proba II va indica valoarea majoră, însă nu mai mare decît 160mg/100mL. Ulterior, descreşte şi proba IV – aproximativ se egalează cu prima. În diabet, probele III şi IV rămîn în plafon (crescute) ca şi proba II (cantitatea normală de glucoză este de 3,3-5,5 mmol/L).

Factorul principal ce determină micşorarea toleranţei la glucoză în funcţie de vîrstă e diminuarea sensibilităţii ţesuturilor la insulină. Afecţiunile intercurente, preparatele medicale pot influenţa asupra toleranţei.

Testul glucotolerant intravenos. Se administrează 50% glucoză intravenos timp de 2-4 minute în doza de 0,5g/kg masa corpului (25g), apoi se determină în sînge valorile glicemiei, peste fiecare 10 minute, timp de o oră. Se stabileşte constanta vitezei

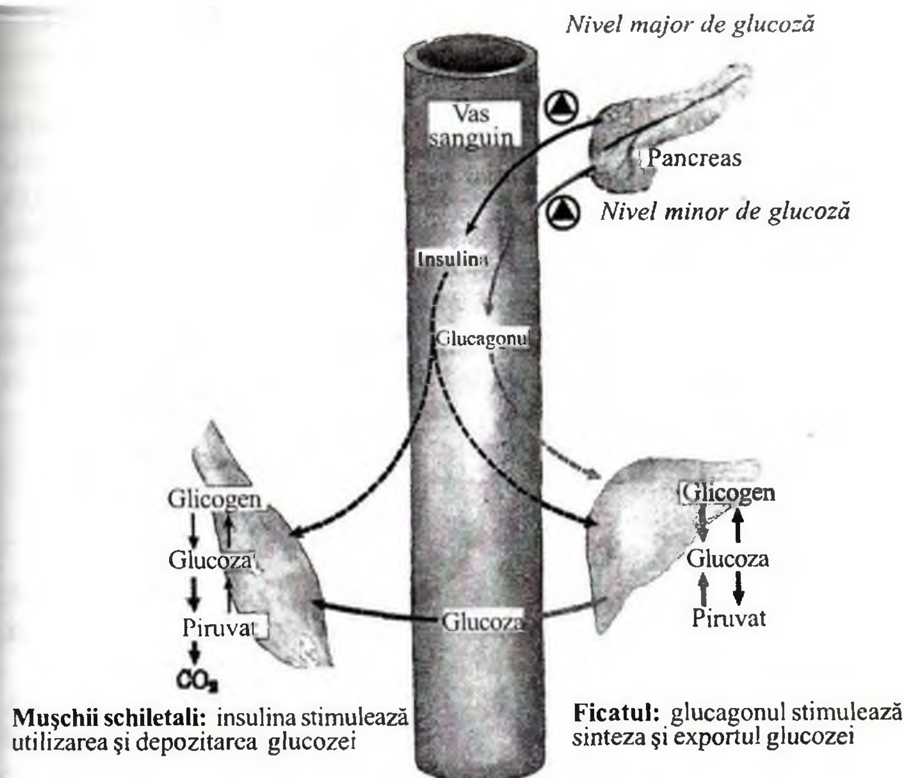


Figura 4.21. ***Reglarea glucozei sanguine de insulină şi glucagon***

micşorării nivelului de glucoză la T1/2 (timpul necesar pentru diminuarea nivelului glucozei în jumătate, normal e mai mare de 1,2). În patologie, această constantă e mai mică decît 1.

O importanţă deosebită îi revine *fructozei,* cu nivelul sanguin pînă la 0,5mmol/L. Se utilizează testul de toleranţă la fructoză; per os se administrează 45-50 g fructoză în 200 mL de apă, recoltarea probei de sînge după 30 minute, timp de două ore. În mod normal, valorile fructozemiei rămîn sub 0,83 mmol/L şi revin la limitele normale după 2 ore.

Prezintă interes cantitatea ***de galactoză***, cu valori normale pînă la 239 μmol/L sau 0,24 mmol/L. *Testul de încărcare cu galactoză* (oral) constă în utilizarea soluţiei de 10% de galactoză ce conţine 1,7 g/kg corp la copii pînă la 3 ani, şi 0,75 g/kg corp după 9 ani. Se efectuează o recoltare obişnuită de probe sanguine. De altfel, se depistează şi în urină, timp de 5 ore după fiecare oră. La copiii de pînă la 3 ani galactozuria atinge 5,55 mmol (1g); după 3 ani se excretează 11,11mmol (2g); la adulţi valorile sunt egale cu 16,65 (3g). Se calculează şi indicele galactozei (suma celor 4 determinări ale galactozemiei). Valori normale: 5,5 mmol/L - 8,88 mmol/L.

Este utilizat şi testul intravenos cu galactoză (0,33g la kg/corp); se recoltează sîngele după 10 minute, timp de 80 minute. Se calculează timpul de înjumătăţire (T1/2) a galactozei (normal este egal cu 9,4 - 11,6 minute).

CAPITOLUL V. LIPIDELE ŞI METABOLISMUL LOR

STRUCTURA. PROPRIETĂŢILE. FUNCŢIILE

Natura chimică e foarte variată. După structură şi compoziţie, lipidele se împart în două subclase: simple şi complexe. Lipidele simple sunt compuşi ce conţin C, H şi O (acilglicerolii, steridele, ceridele). Lipidele complexe sunt compuşi care, pe lîngă C,H,O, mai pot să conţină atomi de P, N sau S – glicerofosfolipidele, sfingolipidele, sulfatidele.

Deosebim *lipide saponifiabile*, care prin hidroliză se descompun în substanţe componente, şi *nesaponifiabile*, care reunesc diverse categorii de compuşi, hidrocarburi superioare, derivaţi oxigenaţi ai acestora, nescindaţi hidrolitic în compuşi simpli. La ultima clasă se referă şi alcoolii, aldehidele, acizii care conţin schelete alifatice sau ciclice, cu structură poliizoprenică: terpenele, carotenoizii, steroizii.

Funcţiile lipidelor sunt:

1) depozitarea şi transportul rezervelor energetice;

2) constituenţi structurali ai membranelor celulare şi intracelulare;

3) izolatori termici, mecanici, electrici;

4) joacă un rol important în procesele de comunicare şi identificare intercelulară;

5) unele substanţe, fiind solubile în lipide, pot avea efecte biologice: vitamine, steroizi, prostaglandine, derivaţi ai acizilor graşi nesaturaţi.

Natura a creat o sumedenie de compuşi lipidici, ce diferă după structura lor chimică. Studiile recente au confirmat că nu numai prostaglandinele, dar şi multe altele prezintă factori valoroşi ca reglatori şi mediatori practic ai tuturor proceselor fiziologice şi ai reacţiilor biochimice.

S-a stabilit că glicosfingolipidele participă în procesele de creştere, diferenţiere şi sesizare celulară, la interacţiunea intercelulară, transmiterea semnalelor intermembranare; pot servi ca antigeni şi imunomodulatori activi. Unele sfingolipide simple şi metaboliţii lor (*sfingozina, sfingozin-1-fosfat, ceramidele*), în calitate de mesageri secunzi participă atît la creşterea şi diferenţierea celulelor, cît şi la apoptoza lor. Participă, la transmiterea informaţiei reprezentanţii ciclului *fosfatidilinozitolului – diacilglicerolul, inozitolfosfatul, inozitol-1,4,5-trifosfatul, acidul fosfatidic*, care modifică activitatea unor forme de proteinkinaze C, modulînd cantitatea Ca^{2+} în celule. Procesele biologice din sînge sunt reglate de *1-O-alchil-2-acetilfosfatidilcholină* (factorul de agregare a trombocitelor).

Dacă lizolecitinelor (*lizofosfatidilcholinei*) li se atribuia numai rol de detergent endogen, apoi la moment se constată că în concentraţii mici (1-10 mkM) au şi funcţia de reglare a PKC.

Efect neuromodulator posedă amidele acizilor graşi – *etanolamida ac. arahidonic (anandamida)*, care apare ca ligand endogen al receptorilor în creier. *Oleamida* posedă funcţie de inductor endogen al somnului la mamifere.

Oxidarea radical liberă a lipidelor de formele active ale O_2 e considerată azi o cale de sinteză a moleculelor, cu activitate biologică deosebită. *Izoprostanele*, produsele oxidării acidului arahidonic prezintă activitate biologică deosebită şi sunt un criteriu valoros al intensităţii oxidării radical libere a lipidelor. Împreună cu *izoleucotrienele* şi alte *izooxilipine* prezintă o clasă de lipide, ce apar ca mediatori ai stresului oxidativ.

Celula poate fi expusă acțiunii simultane a mai multor factori lipidici, avînd în consecință efecte biologice diferite. Unul și același agonist (*γ-interferonul, interleukina-1β, factorul necrotic tumoral*) favorizează apariția în celulă a mai multor mesageri lipidici care determină procesele biochimice.Determinarea factorului - cheie e dificil în patogeneza efectelor celulare.

Acizii grași. Dintre acizii grași cei mai răspîndiți și mai numeroși sunt acizii monocarboxilici alifatici cu catenă normală, saturată sau nesaturată, ce includ un număr par de atomi de carbon.

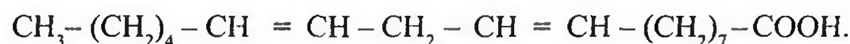
Lipidele izolate din țesuturile mamiferelor mai des conțin acid palmitic (C_{16}) și stearic (C_{18}). Substanța nervoasă are cantități substanțiale de acid lignoceric (C_{24}). Acizii inferiori (C_4-C_{10}) se atestă în grăsimile din laptele rumegătoarelor (tab.5.1).

Tabelul 5.1 ***Principalii acizi grași ai grăsimilor naturale***

Acizii grași saturați	Numărul de atomi de C în moleculă	Formula structurală
1. Acidul acetic	C_2	CH_3-COOH
2. Acidul butiric	C_4	$CH_3-(CH_2)_2-COOH$
3. Acidul caproic	C_6	$CH_3-(CH_2)_4-COOH$
4. Acidul caprilic	C_8	$CH_3-(CH_2)_6-COOH$
5. Acidul caprinic	C_{10}	$CH_3-(CH_2)_8-COOH$
6. Acidul lauric	C_{12}	$CH_3-(CH_2)_{10}-COOH$
7. Acidul miristic	C_{14}	$CH_3-(CH_2)_{12}-COOH$
8. Acidul palmitic	C_{16}	$CH_3-(CH_2)_{14}-COOH$
9. Acidul stearic	C_{18}	$CH_3-(CH_2)_{16}-COOH$
10. Acidul arahic	C_{20}	$CH_3-(CH_2)_{18}-COOH$
11. Acidul behenic	C_{22}	$CH_3-(CH_2)_{20}-COOH$
12. Acidul lignoceric	C_{24}	$CH_3-(CH_2)_{22}-COOH$

Acizii grași nesaturați conțin una sau mai multe legături duble etilenice care, ca regulă, ocupă poziția între C_9 și C_{10}-cis-Δ^9.

Legăturile multiple duble, se situează între atomul C_9 și grupa CH_3, nefiind cuplate, dar cu interferența grupei metilenice:



$$CH_3-(CH_2)_4-CH=CH-CH_2-CH=CH-(CH_2)_7-COOH.$$

Practic, toate legăturile duble se află în cis-conformația ce modifică poziția catenei alifatice în spațiu. Cu cît mai multe legături duble există, cu atît mai multe coturi posedă acizii grași. Acidul arahidonic are o rigiditate mai mare decît cei saturați: ultimii se rotesc liber în jurul legăturilor ordinare și se caracterizează printr-o flexibilitate mare.

Acizii grași nu se află în stare liberă în celule și țesuturi, ci sunt legați covalent, asemeni componentelor din diferite clase de lipide.

Dintre acizii grași nesaturați mai frecvenți sunt:

1) palmitoleatul (acidul palmitoleic) $C_{16:1}$ cis-Δ^9;

2) oleic $C_{18:1}$ cis-Δ^9;

3) nervonic $C_{24:1}$ cis-Δ^9.

Cu 2 legături duble în moleculă:

Acidul linoleic $C_{18:2}$ cis-Δ^9, Δ^{12};

Cu 3 legături duble:

Acidul linolenic $C_{18:3}$ cis-Δ^9, Δ^{12}, Δ^{15};

Cu 4 legături duble:

Acidul arahidonic $C_{20:4}$ cis-Δ^5, Δ^8, Δ^{11}, Δ^{14}.

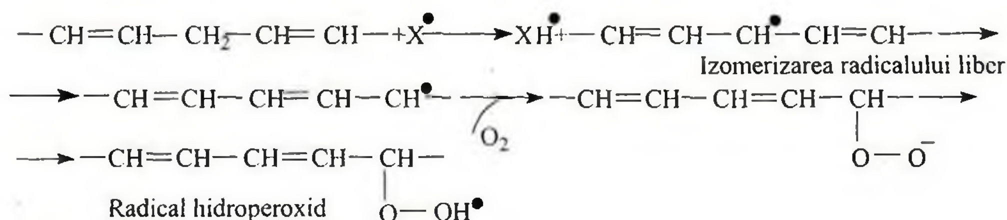
Proprietățile. Proprietățile acizilor grași și ale lipidelor, servind drept constituenți, în mare masură depind de lungimea catenei acidului și de gradul de nesaturație. Acizii grași nesaturați au o T°C de topire mai joasă decât cei saturați cu lungime similară a catenei (acidul stearic - 69,6°C, oleic - 13,4°C, acidul linoleic - 5,8°C). Lungimea catenei influențează asupra T°C de topire. Acidul palmitic (C_{16}) are o T°C cu 6,5 mai mică decît a celui stearic (C_{18}). Cu alte cuvinte: lungimea mică a catenei și prezența legăturilor duble amplifică fluiditatea acizilor grași și a derivaților lor. La T° corpului acizii grași saturați C_{12}-C_{24} sunt în stare solidă (ca ceara), cei nesaturați sunt lichizi. Tot lichizi sunt și cei saturați pînă la C_8.

Acizii grași sunt puțin solubili în apă. Solubilitatea scade o dată cu creșterea lungimii catenei hidrocarbonate. Acizii grași saturați și nesaturați au proprietate de a forma:

1. Esteri (gliceride, fosfogliceride);
2. Săruri (săpunuri cu proprietăți tensioactive), cele de Na^+ și K^+ sunt solubile în apă; cu ceilalți ioni, în general, formează săruri insolubile;
3. Amide (sfingolipide).

Acizii grași nesaturați adiționează, la nivelul dublei legături, halogeni (Br_2,Cl_2), tiocianatul $(SCN)_2$, gruparea hidroxil. Ei se oxidează ușor cu permanganatul de potasiu, acidul periodic, tetraacetatul de plumb, peroxiacizii. Reacțiile de oxidare se utilizează în scopul stabilirii structurii lor chimice.

Oxidarea acizilor grași nesaturați are loc și în prezența ozonului. Ei sunt supuși procesului de peroxidare (autooxidare), la care se alterează gustul și mirosul (rîncezire). Radicalii peroxidici atacă alte catene nesaturate, inițiind reacția de peroxidare în lanț.



Reacția de peroxidare în lanț: X - radical inițiator

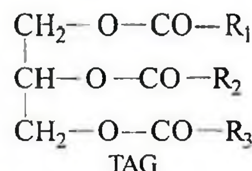
Țesutul adipos uman conține (în % din greutate) următorii acizi grași:
oleic = 45; palmitic = 25; linoleic = 8; palmitoleic = 7; stearic = 7 și alții = 7%.

Uleiurile vegetale sunt bogate în acizi grași nesaturați.

Autooxidarea lipidelor ce conțin acizi grași nesaturați în celule este sistată de prezența vitaminelor E, C, diferitelor enzime. Acest fenomen poate provoca anomalii lipidice în țesuturi.

Lipidele saponifiabile. *Gliceridele* (grăsimile neutre, acilglicerolii) reprezintă esterii glicerolului cu acizii grași, constituind grăsimi de rezervă.

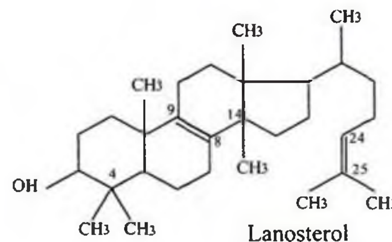
Acizii grași constituenți sunt răspîndiți destul de uniform în toate moleculele de triacilgliceroli (TAG) mixte. Aceste lipide sunt mai ușoare decît apa și nu se dizolvă în ea. Fiind în stare dehidratată și redusă, TAG este o rezervă valoroasă de energie metabolică. La oxidarea unui gram se elimină 9 kcal, pe cînd la oxidarea glucidelor – 4 kcal; 1 g de glicogen uscat leagă 2 g apă. Prin urmare, într-un gram de grăsime se depozitează de 6 ori mai multă energie decît într-un gram de glucide. Din greutatea totală a omului (70 kg), TAG le revin 11. Dacă energia ar fi conservată numai în glicogen, greutatea corpului ar spori cu 55 kg.



TAG

Cerurile, esterii acizilor grași superiori cu catenă liniară și alcooli alifatici sau ciclici cu masă moleculară mare. Ceridele sunt substanțe solide, amorfe, au caracter hidrofob, sunt secretate de epiderma animalelor și plantelor, formează un strat protector împiedicînd pierderea de apă. Sunt sintetizate și utilizate în cantități mari de planctoane, ce se folosesc în hrana unor pești de valoare.

Ceara de albine este un ester al acidului palmitic și al alcoolului miricilic (C_{30}) $-H_3C-(CH_2)_{14}-CO-O-CH_2-(CH_2)_{28}-CH_3$. Spermacetul reprezintă un ester al acidului palmitic și al alcoolului cetilic (C_{16})$-H_3C-(CH_2)_{14}-CO-O-CH_2-(CH_2)_{14}-CH_3$.

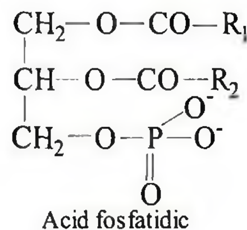


Lanosterol

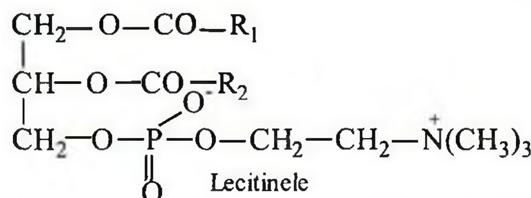
Lanolina, grasimea naturală de pe lînă de oaie, este un ester al lanosterolului și agnosterolului cu acizii grași. Lanosterolul este un compus tip dienic, avînd și alți substituenți metilenici la C_4 și C_{14}. Ceridele sunt constituenți ai unguentelor, cremelor, de altfel utilizate în cosmetică, farmacie.

Fosfatidele, lipide structurale, nu se depozitează ca rezervă. La baza lor structurală se află *acidul fosfatidic*. Organismele vii îl conțin în cantități mici în stare liberă, fiind intermediar în metabolismul fosfatidelor.

Prin legarea grupei fosforil cu diverși alcooli rezultă fosfatidele. Acizii grași nesaturați mai des formează esteri cu C_2 din glicerol – acest atom devine asimetric cu L-configurație.



Acid fosfatidic



Lecitinele

Cele mai răspîndite fosfatide sunt:

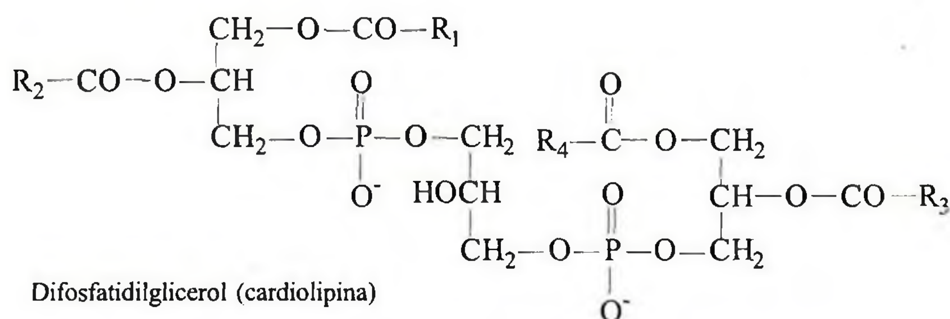
a) *Fosfatidilcholinele (lecitine)* conțin cholina ($OHCH_2—CH_2—N^+(CH_3)_3$.

Aceste lipide au caracter amfipatic, proprietăți tensioactive pronunțate, formează în apă micelii, sunt neutre la electricitate ca și b) *fosfatidiletanolamina* (cefalinele) ce se conține din abundență în țesutul nervos.

Cefalinele, cu 2 resturi de palmitil, sunt componentele lipidice principale ale "surfactantului pulmonar", ce acoperă alveolele și împiedică colapsul la expirare. Surfactantul include într-o proporție mare și fosfatidilglicerolul.

Fosfatidilglicerolul, fiind un lipid fără azot, conține unul sau două resturi de fosfatidil legat de glicerol.

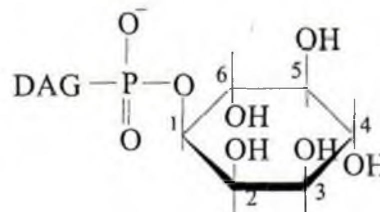
Difosfatidilglicerolul *(cardiolipina)* e unul din componenții membranei interne mitocondirale.



Difosfatidilglicerol (cardiolipina)

b) *Fosfatidilserinele* (acidul fosfatidic + serina) au o sarcină negativă.

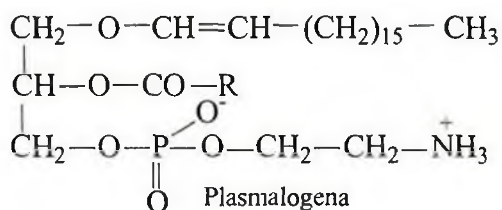
c) *Fosfatidilinozitolii,* de asemenea, au o sarcină negativă, se găsesc în cantități mari în țesutul nervos, existînd în două forme fosfatidilinozitol-4-fosfat ($PIP_1(4)$) și fosfatidilinozitol-4,5-difosfat ($PIP_2(4,5)$), ce joacă roluri importante în procesul de emitere a mesajelor extracelulare.



Fosfatidilinozitol

d) *Plasmalogenele (alchenilfosfatide)* sunt numeroase în mușchi și nervi, de C_1 este legat un enol alifatic superior, iar mai frecvent, ca alcool azotat, este etanolamina.

Fosfolipazele sunt enzime ce scindează fosfolipidele. *Fosfolipaza A_2* - se conține în veninul de șarpe; catalizează specific hidroliza acizilor grași în poziția doi, formînd lizofosfatide ce distrug membranele (în stare normală nu sunt toxice).



Plasmalogena

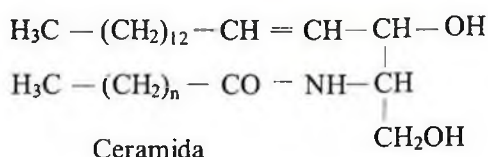
Fosfolipaza B hidrolizează lipidele în poziția 1 și 2 sau numai în poziția 1, *fosfolipaza C* hidrolizează acidul fosforic cu glicerolul. În consecința acțiunii *fosfolipazei D,* se formează acidul fosfatidic.

În membranele plasmatice ale diverselor eucariote unicelulare, fosfatidele sunt

reprezentate de *fosfonolipide*. Aceste lipide sunt caracterizate printr-o legatură fosfor-carbon (2-aminoetil-fosfonolipid) analogic cu fosfatidiletanolamina.

La această grupă de lipide se referă şi *endocanabinoidele* care se deosebesc structural de endorfine (natură peptidică). Endocanabinoidele sunt derivate ale acidului arahidonic. Principalii compuşi sunt arahidonil-N-etanolamina (grupa COOH a acidului arahidonic este legată de grupa aminică a etanolaminei) şi 2-arahidonil-glicerol (grupa COOH a acidului arahidonic formează legătura esterică cu grupa alcoolică secundară din glicerol). Aceşti compuşi sunt prezenţi în ţesuturile (creier, inimă, rinichi, ficat, piele) mamiferelor. În aceste ţesuturi 2 receptori (CB1 şi CB2) fixează aceşti compuşi. Derivaţii etanol-aminei sunt recunoscuţi de CB1, cei ai glicerolului – de CB1 şi CB2. Ambii receptori sunt cuplaţi cu G-proteinele, activîndu-le sau inhibîndu-le. O parte din endocanabinoide pot conţine şi acizi graşi cu catenă mai mică: acidul miristic (14:0) sau acidul lauric (12:0). Receptorii reacţionează la aceşti compuşi în concentraţii mari. Se consideră că în creierul mamiferelor ei joacă un rol protector antioxidant.

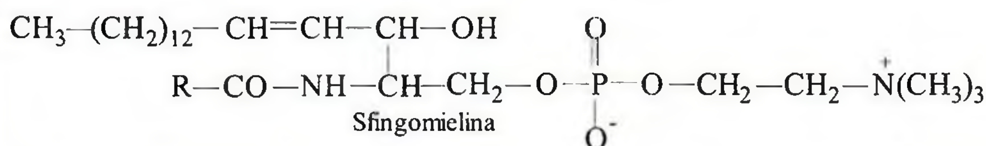
Sfingolipidele, constituenţii structurali ai membranelor, sunt derivaţi ai unui aminoalcool superior – sfingozina (dihidrosfingozina - sfingonina), legat prin grupa aminică cu acidul gras şi formînd ceramida.



Ceramida

Există două categorii de sfingolipide:

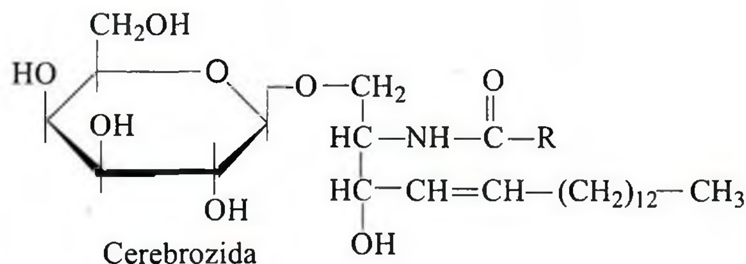
1) *Sfingomielinele* – componente ale substanţei nervoase albe în nervii periferici; conţine o ceramidă legată de un rest de fosforilcholină. Structura lor se diferenţiază prin natura ceramidei în care se pot amidifica diverşi acizi (lignoceric, nervonic etc.)



Sfingomielina

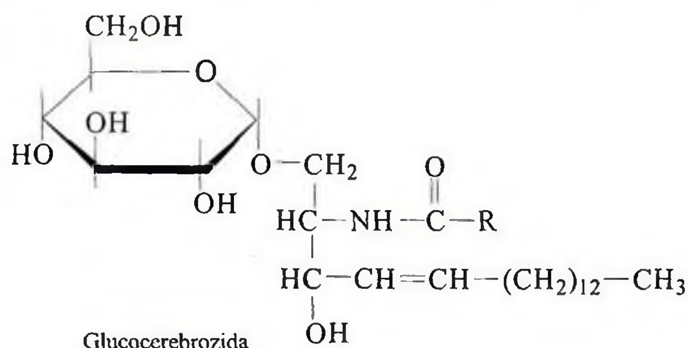
2) *Glicosfingolipidele* care includ ceramida legată glucozidic de monozaharide (C_6) sau oligozaharide.

a) *Cerebrozidele* se află în cantităţi mari în substanţa albă a creierului, în nervi. Ceramida e legată cu β-galactoza; în calitate de acid gras, se utilizează acidul lignoceric (C_{24}). Cerebrozidele mixte conţin 2,3,4 resturi de zahăr.



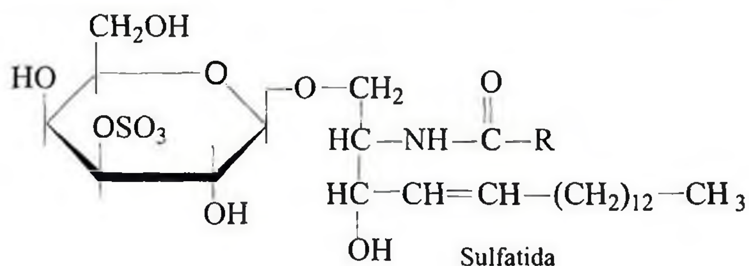
Cerebrozida

b) *Glucocerebrozidele* conțin constituenți ai membranelor celulelor (nu nervoase); glucidul de bază este glucoza. Denotă caracter amfipatic și nu au sarcini electrice.



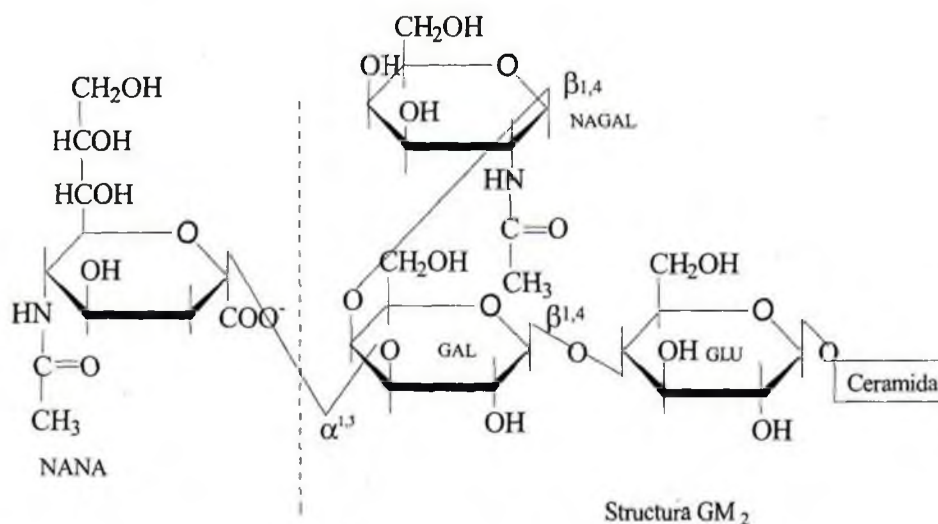
Glucocerebrozida

c) În creier, *galactocerebrozidele* mai conțin și resturi sulfat legate esteric de galactoză – *sulfatidele,* ionul $-OSO_3$ e legat cu atomul 3 din galactoză.



Sulfatida

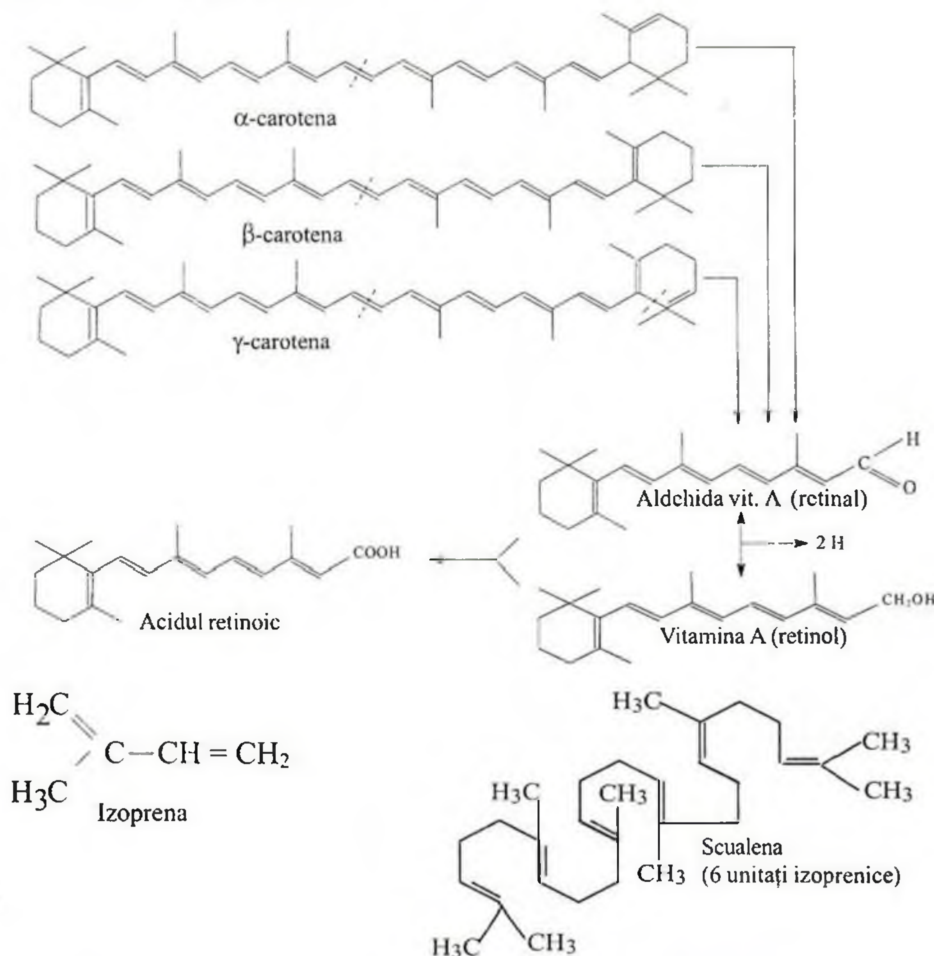
d) *Gangliozidele* sunt glicolipide ce conțin unul sau mai multe resturi de acid sialic (NANA), care la pH=7,0 comportă sarcină negativă. Ele, la rîndul lor, se clasifică și se identifică după numărul resturilor de acid sialic (GM,GD, GT).



Structura GM₂

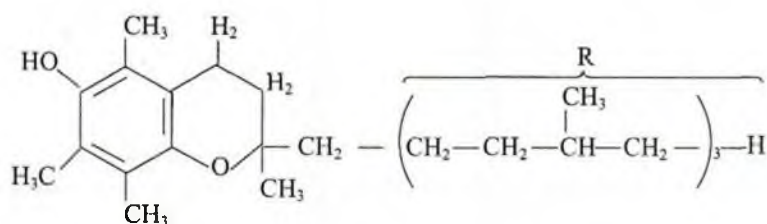
Natura oligozaharidului este desemnată printr-un indice numeric, 5-n (n-numărul de unități hexozil). Se situează pe suprafața exterioară a membranelor, fragmentelor receptorice specifice, mai ales în locusul de fixare a moleculelor de neuromediator în timpul procesului de transmitere chimică a mesajului de la o celulă nervoasă la alta.

Lipidele nesaponifiabile. Aceste lipide au o structură poliizoprenică, cu un grad mai mic sau mai mare de nesaturare, manifestă funcții oxigenate. Această grupă include terpenele, carotenoizii (α, β, γ) și steroizii.

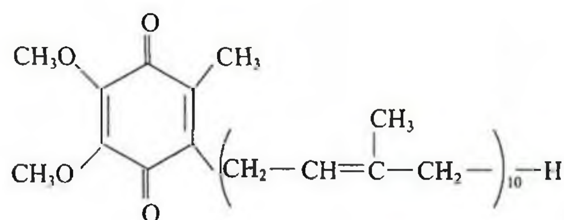


Terpenele (hidrocarburi poliizoprenice) intermediare, în cantități mici, participă la biosinteza colesterolului (scualenul), vit. K, E, ubichinonei. Un număr major de compuși sunt prezenți atît în lumea vegetală, cît și animală, în bacterii, sub forma polimerizării unităților de izopren.

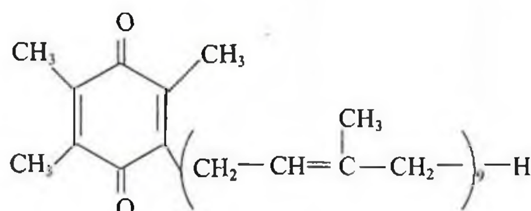
Carotenoizii din materia vie se află: a) în stare liberă solubilizați în lipide și sub formă de microcristale; b) în diverse combinații cu protide, lipide sau cu glucide (carotenoproteide; esteri carotenoidici și glicozide carotenoidice). Biosinteza carotenoizilor nu are loc în organismul omului și animalelor. Aportul de carotenoizi este asigurat de resursele alimentare. Fiind absorbite și metabolizate în organism se formează



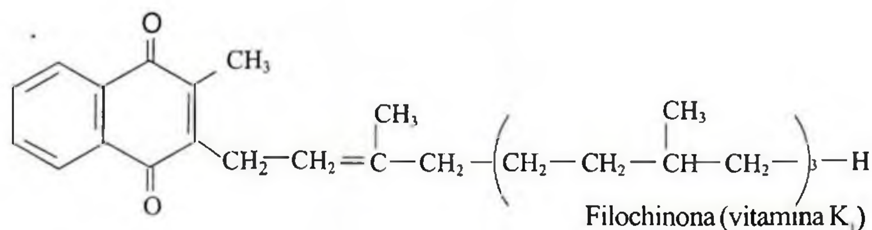
α-tocoferolul (vitamina E)



Ubichinona-coenzima Q_{10}



Plastochinona

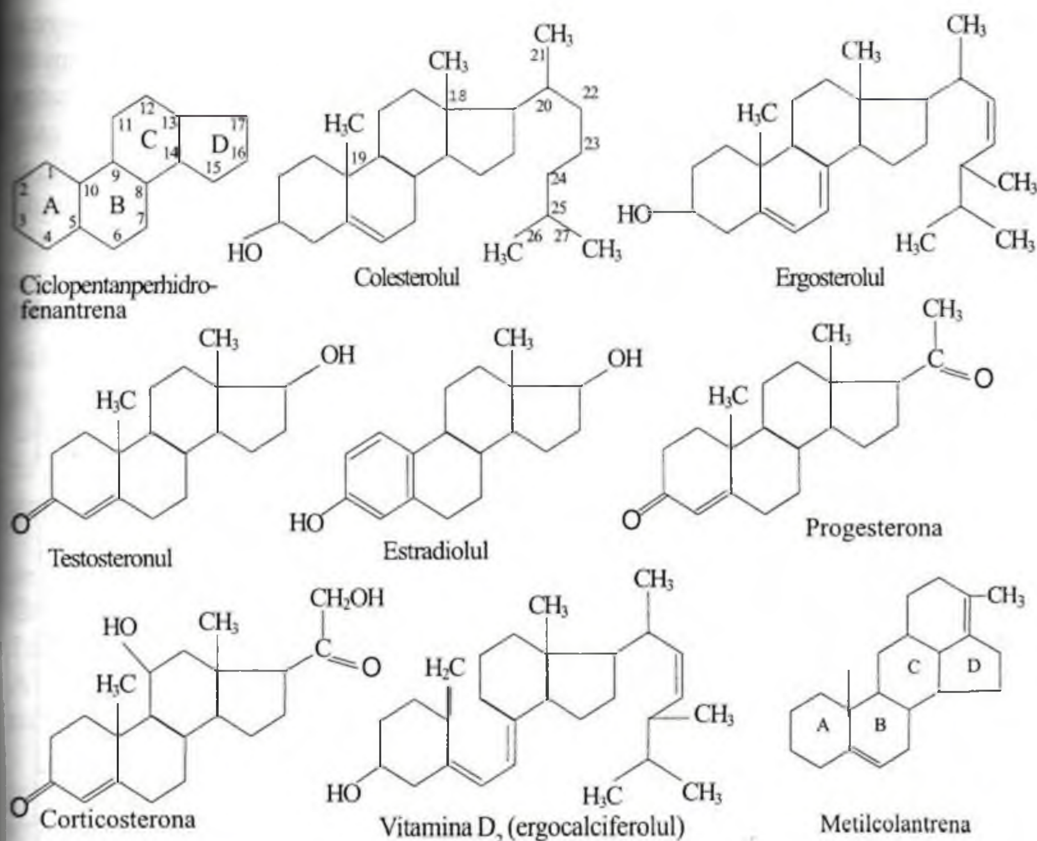


Filochinona (vitamina K_1)

Structura izoprenului şi diverse hidrocarburi derivate

carotenoizii specifici proprii. Carotenoizii sunt considerați apartenenți ai clasei terpenoizilor. Unitatea structurală de bază este izoprenil pirofosfatul. În alta clasă se includ şi derivați: fitolul, vitaminele A,E,K, chinonele ş.a.

Steroizii sunt compuşi ai ciclopentanperhidrofenantrenei şi conțin grupa OH la C_3, o catenă alifatică din 8-10 atomi de C la C_{17}. Colesterolul este cel mai important sterol din regnul animal şi component esențial al tuturor structurilor membranare. Există în stare liberă sau esterificat cu acizi graşi, fiind precursorul tuturor celorlalți compuşi steroidici, formînd steride, mai des în poziția 3 este esterificat cu acizi graşi nesaturați. La oxidarea colesterolului, se formează *7-dihidrocolesterol (provitamina D_3)*. În această grupă intră şi acizii biliari – componenți ai bilei.



Structura diverşilor steroizi

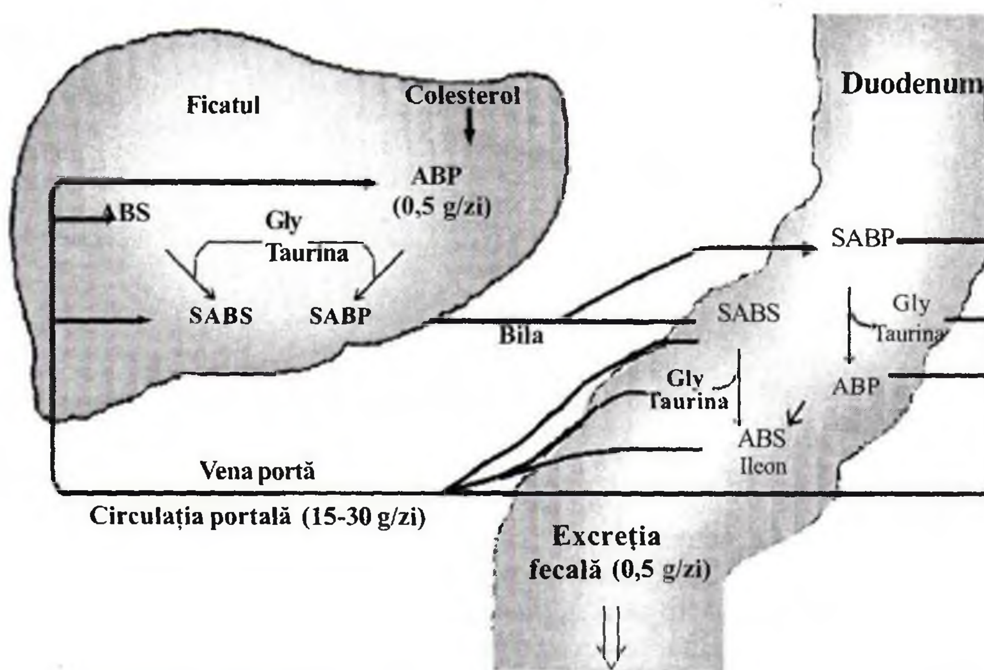
Una dintre cele mai active substanţe cancerigene extrase din bilă e metilcolantrena. Proprietăţi analoage poate avea şi produsul metabolizării testosteronului. Aceşti intermediari se inactivează normal în ficat graţie oxidării microzomale.

Acizii biliari. Organismul uman nu dispune de enzime care degradează nucleul sterolic. O modalitate de metabolizare a colesterolului este sinteza hepatică a acizilor biliari. În mod normal, biosinteza şi aportul alimentar de colesterol se află în echilibru cu pierderea zilnică a colesterolului sub formă de acizi biliari şi derivaţi ai acestora.

Sinteza acizilor biliari primari are loc în ficat şi implică acţiunea coordonată a mai multor enzime diferite, localizate în diverse compartimente intracelulare. Are loc hidroxilarea în poziţiile 7α şi C_{12}, apoi izomerizarea funcţiei alcool (C_3-α), cu saturarea în poziţia 5-6. Catena laterală este scurtată, conducînd la generarea de propionil-CoA şi utilizat, în consecinţă, în ciclul Krebs.

Sărurile biliare au eficienţă mai mare în emulsionarea şi digestia lipidelor, comparativ cu acizii biliari. Aceasta se datorează faptului că sărurile biliare au pK mai scăzut decît acizii biliari. Spre exemplu, pK pentru acizii biliari este de aproximativ 6, pentru derivaţii glicoconjugaţi – aproximativ 4 şi pentru sărurile conjugate cu taurina este de aproximativ 2. Scăderea pK se explică prin creşterea procentului de molecule prezente în formă

ionizată la pH-ul intestinal de aproximativ 6, ceea ce permite o mai bună solubilizare a lipidelor. Sărurile biliare nu sunt absorbite împreună cu lipidele alimentare, ci dispun de un transportator specializat care asigură absorbția lor la nivelul ileonului. Majoritatea sărurilor biliare sunt reabsorbite, transportate prin vena portă și recaptate de ficat, care le elimină din nou în fluxul biliar. Astfel se formează circuitul hepato-entero-hepatic al sărurilor biliare. Sărurile biliare care nu au fost absorbite în ileon ajung în colon, unde sunt deconjugate de către bacteriile intestinale. Printr-o reacție de dehidrogenare (în poziția C_7-α) rezultă acizii biliari secundari: acidul litocolic (hidroxilat în poziția C_3) și acidul dezoxicolic (hidroxilat în pozițiile C_3 și C_{12}). Aceștia sunt parțial absorbiți la nivelul colonului și reutilizați de ficat, după captare și reconjugare.



Circuitul hepato-entero-hepatic al acizilor și sărurilor biliare
***Notă:** ABP – acizii biliari primari; ABS – acizii biliari secundari; SABP – sărurile acizilor biliari primari; SABS - sărurile acizilor biliari secundari*

Circuitul hepato-entero-hepatic are rolul de a economisi necesarul de colesterol pentru sinteza acizilor biliari. Acizii biliari prezenți în organism totalizează aproximativ 2-4g, dar reciclarea lor permite deversarea în intestin a 12-32 g de săruri biliare/zi. Fracțiunea care se pierde prin eliminare fecală (aproximativ 0,5 g/zi) este compensată de sinteza hepatică. Reglarea biosintezei acizilor biliari este corelată cu cea a colesterolului.

MEMBRANELE BIOLOGICE

Membranele biologice reprezintă structuri superorganizate, posedînd constituenții de bază – proteinele şi lipidele. Joacă un rol decisiv la vitalitatea celulelor, separîndu-le de mediul extern şi determinînd individualitatea lor. Membranele nu prezintă un obstacol rigid, ci o barieră de permeabilitate selectivă de o sensibilitate aparte, conținînd pompe moleculare specifice şi canale. Aceste sisteme de transport reglează componența moleculară şi ionică a mediului intracelular.

Funcțiile de bază sunt multiple, complexe şi dinamice:

1. Pentru celulă, la fel ca şi pentru compartimentele ei, membranele îndeplinesc funcția de barieră mecanică, dar nu inertă, statică. Membranele sunt flexibile, labile, permanent se înnoiesc, rămînînd elastice şi dure la deformare. Celulele eucariote întrunesc şi membrane interne, ce separă organitele – mitocondriile, lizozomii. Specializarea funcțională în procesul evolutiv e indispensabilă de formarea segmentelor intracelulare separate, numite compartimente ce asigură o individualitate specifică.

2. O funcție centrală e permeabilitatea selectivă, cuplată cu menținerea homeostazei intracelulare. Deplasarea ionilor şi a substanțelor prin membrane poate fi pasivă, fără utilizarea energiei, favorizată de difuzia după gradientul de concentrație sau electric. Transportul activ contra potențialului chimic sau electric are loc o dată cu folosirea ATP. Aceste sisteme de transport asigură transferul în celulă al moleculelor specifice de substanțe nutritive organice – glucoza şi alți ioni sau produse rezultante ale lor.

3. Generarea potențialului bioelectric, conducerea excitației. E stabilit că suprafața membranelor posedă grupe electrice cu anumită sarcină, ce favorizează transmiterea impulsului sub forma unor modificări în undele electrice, de-a lungul axonului sau celulei.

4. Membranele îndeplinesc şi o funcție metabolică însemnată, determinată de asociații multiple de enzime sau sisteme enzimatice situate pe suprafața lor, ce diferă pe ambele părți. Procesele de transformare a energiei din cadrul sistemelor biologice se produc în sistemele membranare, ce conțin complexe de enzime integrale şi proteine. Spre exemplu: fotosinteza, proces de transformare a luminii în energia legăturilor chimice, are loc în membranele interne ale cloroplastelor sau fosforilarea oxidativă, ce însoțesc oxidarea substanțelor organice, cu formarea de ATP în membrana interna a mitocondriilor.

5. Membranele reglează schimbul de informație între celule şi mediul ambiant. Posedă receptori specifici, ce sesizează excitanții exteriori. Interacțiunea celulară este efectuată de membrane. Acest schimb de informație are loc în timpul contactelor intercelulare, structuri specializate formate din membrane citoplasmatice şi componente ale straturilor premembranare. Contactelor intracelulare le este proprie o mică rezistență electrică, cu o permeabilitate mare, ceea ce permite realizarea interacțiunii prin difuzia substanțelor în mediul respectiv sau prin transfer direct.

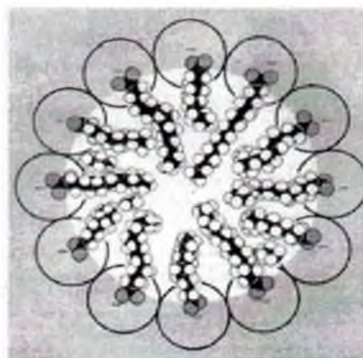


Figura 5.1. ***Aranjarea moleculelor în micelă***



Figura 5.2. ***Tipuri de micele***

Actul primar constă în identificarea semnalului receptorilor specifici de pe membrană. Receptorii, după structură, constituie glicoproteide. Transformarea mesajelor chimice în forma preluată de celulă are loc cu participarea adenilat- sau guanilatciclazelor, situate pe reversul membranei. Generarea semnalului chimic sau electric este un argument care justifică rolul elocvent al membranelor în sistemul de comunicare biologică.

6. Membranele dispun de locusuri de sesizare specifică nu numai la hormoni, dar posedă şi locusuri specifice caracteristice pentru fiecare individ sau specie, denumite locusuri ale compatibilităţii tisulare.

Proprietăţile generale ale membranelor biologice

Ele diferă după structură şi funcţie, dar atestă şi proprietăţi comune:

1. Reprezintă o structură plată cu o grosime de cîteva molecule, formînd barieră integră între compartimente, cu lungimea aproximativă de 60 - 100 Å.

2. Componenţa lor de bază sunt lipidele şi proteinele. Raportul dintre ele variază de la 1:4 pînă la 4:1. Constituenţi ai membranelor sunt şi glucidele.

3. Lipidele sunt reprezentate de molecule relativ mici, ce conţin grupe hidrofile şi hidrofobe. În soluţie apoasă, spontan formează straturi bimoleculare închise. Bistratul lipidic e o barieră pentru compuşii polari. Un segment cu dimensiunile 1x1 mkm întruneşte aproximativ $5 \cdot 10^6$ molecule de lipide.

4. Membranele îşi restabilesc automat integritatea la lezarea mecanică, imediat se închid, se autorestabilesc.

5. Funcţia membranelor e determinată de proteine specifice, ce îndeplininesc rolul de pompe, canale, receptori, enzime transformatoare de energie. Proteinele se intercalează în stratul bilipidic- mediu, necesar pentru activitate.

6. Membranele reprezintă structuri necovalente, supermoleculare; constituenţii membranei sunt asamblaţi datorită interacţiunilor multiple necovalente, cooperatoare după caracter.

7. Membranele sunt asimetrice, suprafaţa lor internă şi externă diferă radical.

8. Membranele prezintă structuri fluide. Dacă componentele bilipidice sau proteice nu se fixează într-un loc anumit, prin intermediul forţelor specifice de interacţiune, apoi ele uşor difundează în planul membranei.

9. Membranele sunt soluţii bidimensionale, dirijate de către proteine şi lipide într-un mod anumit.

Structura

Lipidele. Proprietăţile lipidelor din membrane diferă într-atît încît induc erori esenţiale. Viabil, însă, este principiul general al organizării structurale: lipidele membranare sunt compuşi amfipatici. Moleculele lor posedă proprietăţi hidrofile şi hidrofobe. Ele pot fi exprimate în felul următor: partea hidrofilă – capul polar – se reproduce în formă de cerculeţ, pe

cînd catena hidrocarburică – în linii ondulate. Se iscă întrebarea firească: cum se comportă glicolipidele sau fosfolipidele în soluție apoasă? Capetele hidrofile sunt compatibile cu apa, pe cînd cozile resping apa. În soluție apoasă formează micele, în care capetele se află la suprafață, pe cînd cozile – înăuntru (fig.5.1; 5.2). E posibilă şi o altă organizare, care ar satisface aceste cerințe: formarea stratului bimolecular sau bistratului lipidic. S-a constatat că în soluții apoase se formează anume stratul bilipidic şi nu micele. O atare preferință pentru bistrat are o însemnătate esențială în biologie. Micela posedă un diametru mai mic decît 200 Å, pe cînd straturile lipidice pot atinge valori macroscopice – pînă la 1 mm (10^7Å). Fosfo- şi glicolipidele servesc drept constituenți- cheie ai membranelor anume datorită capacității de a forma straturi bimoleculare, care, fiind în stare fluidă, îndeplinesc funcția de barieră a permeabilității (fig.5.3; 5.4).

Cum se formează şi care sunt forțele ce favorizează asamblarea lor?

Formarea bistratului lipidic se realizează prin autoasamblare. Cu alte cuvinte, capacitatea de a forma bistratul e determinată de structura moleculelor lipidice şi de proprietățile lor amfipatice. Formarea lor în apă se produce spontan. Forța principală ce asigură autoasamblarea e interacțiunea hidrofobă. Pe masură ce cozile hidrocarburilor lipidelor membranare nimeresc în partea internă, nepolară a bistratului, ele pierd moleculele de apă ce le înconjurau. Eliminarea apei măreşte entropia sistemului.

Între cozile hidrocarbonate apar interacțiunile Van der Waals, ce favorizează împachetarea lor mai compactă în bistrat. Formarea e cauzată de apariția legăturilor electrostatice şi de hidrogen între capetele polare şi moleculele de apă. În stabilizarea bistratului iau parte aceleaşi forțe care asigură interacțiunile moleculare în sistemele biologice.

Bistratul mai posedă o particularitate – cooperativitatea lui structurală. Integritatea lui este determinată de multiple interacțiuni necovalente, ce se amplifică reciproc.

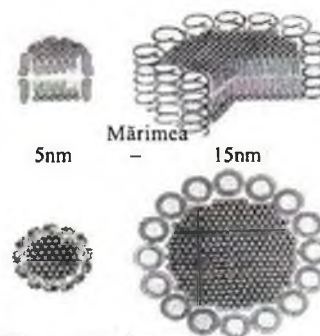


Figura 5.3. *Agregate micelare*

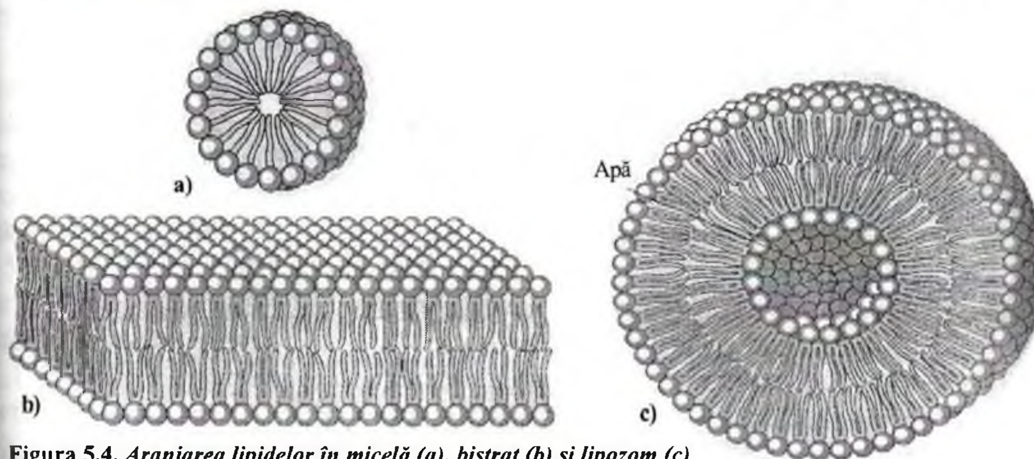


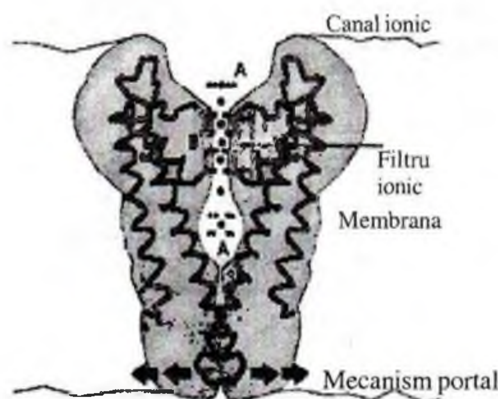
Figura 5.4. *Aranjarea lipidelor în micelă (a), bistrat (b) şi lipozom (c)*

Fosfo- şi glicolipidele formează în apă clastere (conglomeraţi), în care contactul lanţurilor hidrocarbonate cu apa este redus la minimum. Aceşti factori energetici au în consecinţă trei efecte biologice de o valoare majoră: 1) tendinţa de a-şi mări suprafaţa; 2) capacitatea de a se izola (închide în sine) în aşa mod, încît la capete să nu rămînă cozi ce ar putea interacţiona cu apa. Datorită acestei proprietăţi apare un spaţiu izolat (compartiment); 3) straturile bilipidice sunt capabile să se "autosudeze", să se "autosigileze", deoarece orice gaură din strat nu e convenabilă energetic.

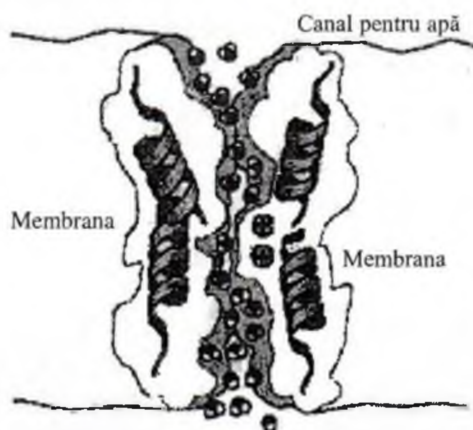
Studierea permeabilităţii bistraturilor lipidice s-a efectuat în două sisteme artificiale: lipozom şi membrane bimoleculare plate, numite *membrane negre*. Lipozomii reprezintă o fază apoasă în stratul bilipidic, fiind formaţi la amestecul rapid al apei cu soluţia de lipide şi etanol (la introducerea acului subţire al seringii se formează bule aproape sterice, cu un diametru de aproximativ 500 Å. Dacă apa conţine ioni sau molecule, se va atesta în faza apoasă a lizozomului). Exemplu: Dacă lipozomii cu diametrul de 500 Å se formează în soluţie de 0,1 mol glicină, apoi în interiorul fiecărui lipozom se vor afla aproximativ 2000 molecule de glicină. Analizînd viteza de ieşire a glicinei din compartimentul intern al lizozomului în mediu, determinăm permeabilitatea membranei.

Lipozomii prezintă interes nu numai pentru studiul permeabilităţii. Ei sunt capabili de o alipire cu membranele plasmatice ale diferitelor celule. Această proprietate oferă mari posibilităţi pentru introducerea în celule a diferitelor substanţe incapabile să traverseze membranele. O alipire selectivă la celulele de anumit tip poate fi uşor utilizată pentru aportul controlat al medicamentelor în celulele-ţintă.

Investigaţiile în această direcţie au demonstrat că membrana lipidică bistrat are o permeabilitate mică pentru ioni şi pentru majoritatea moleculelor polare. Abatere prezinta numai apa ce trece uşor prin membrane.



Strucrura canalului –K^- la Streptomyces lividans. Cerculeţele mari – ionii de K^+, mici – moleculele de H_2O



Transportul moleculelor H_2O prin aquaporine

Doar recent (2004) s-a stabilit că în membrane sunt prezente proteine (*aquaporine*), care posedă o permeabilitate selectivă pentru apă şi sunt absolut impermeabile pentru alţi ioni, inclusiv protonii. Aquaporinele au o masă moleculară de aproximativ 30 kDa şi se găsesc în formă de tetrameri. Se întîlnesc în organismele vii şi au un rol important. Sunt descrise 5 tipuri de aquaporine (AQP-1,2,3,4,5) prezente în diferite ţesuturi. AQP-1 şi AQP-3 sunt necesare pentru funcţionarea normală a rinichiului (reabsorbţia apei în tubii proximali, distali şi colectori). În diabetul insipid nefrogenic sunt descrise AQP-2, ce determină permeabilitatea apei în ductul colector renal. AQP-4 reglează reabsorbţia lichidului cerebro-spinal în sistemul nervos central şi în edemul creierului. AQP-5 iau parte la secreţia lichidului glandelor salivare, lacrimale şi epiteliului alveolar pulmonar. Densitatea aquaporinelor în membranele plasmatice e de 2 x 10^5 copii /celulă. AQP-1 aranjată în membrană prezintă 6 segmente helicale transmembranare. Canalul tetrameric transmembranar are un diametru de $\approx$ 3Å, suficient pentru trecerea moleculelor de apă, cu o capacitate de 5 x 10^8 molecule /sec.

Dereglările în activitatea acestor proteine, de altfel, ca şi defectele genetice conduc la patologii grave. Analiza RS a aquaporinelor a depistat prezenţa unei structuri deosebite de cea a canalelor de K^+. În membrane se formează un canal îngust, cu aranjarea centrală a 2 încărcături pozitive tipice aquaporinelor. Trecerea atît a catonilor, cît şi a anionilor prin acest canal este imposibilă datorită dimensiunilor mici, iar prezenţa sarcinii pozitive stopează şi circulaţie protonilor.

Coeficienţii permeabilităţii pentru compuşii micromoleculari corelează cu raportul solubilităţii lor în solvenţi nepolari faţă de solubilitatea în apă. Această dependenţă ne permite să credem că compuşii micromoleculari trec prin membrana bistrat în felul următor: pierd în prealabil pelicula apoasă, apoi se dizolvă în stratul intern hidrocarbonat al membranei, cu difuzia ulterioară prin acest strat spre cealaltă parte, unde din nou se dizolvă în apă.

Majoritatea proceselor membranare sunt determinate de *proteine*. Şi dacă lipidele membranare formează bariera permeabilităţii şi asigură crearea compartimentelor unice, apoi proteinele specifice asigură funcţii specifice membranelor ca: transportul, transmiterea informaţiei, transformările de energie. Lipidele creează mediul necesar pentru acţiunea acestor proteine.

În structura membranelor, la o moleculă de proteină revin 50 molecule de lipide. La proteine, de asemenea, se pot identifica fragmente hidrofobe şi hidrofile. Grupele polare formează legături între ele în cadrul lanţului polipeptidic, ce penetrează bistratul. Un număr redus de proteine sunt cufundate parţial. Membranele diferă după conţinutul de proteine. *Mielina*, de exemplu, conţine puţine proteine – 18%. Majoritatea membranelor celulare însă manifestă o activitate cu mult mai intensă, iar cantitatea de proteine evoluează la 50%. Membranele interne ale mitocondriilor, adică locul de transformare a energiei, conţin 75% de proteine. Experimental s-a argumentat că membranele cu funcţii diferite diferă după cota de proteine.

Unele dintre proteinele membranare pot fi uşor separate prin intermediul unei soluţii cu forţă ionică mare (1M NaCl), altele sunt bine fixate cu membrana şi pot fi separate prin aplicarea diferiţilor detergenţi sau solvenţi organici. Dată fiind duritatea fixării cu

membrana, proteinele corespunzătoare se clasează în *periferice* şi *integrale* (fig.5.5).

Ultimele formează legături multiple cu catenele hidrocarbonate ale lipidelor membranare şi, deci, pot fi separate cu ajutorul agenţilor ce concurează nelimitat în aceste interacţiuni nepolare.

Proteinele periferice sunt legate cu membranele de forţe electrostatice şi de hidrogen. Aceste interacţiuni polare sunt uşor afectate de adaosul de săruri sau de modificările pH.

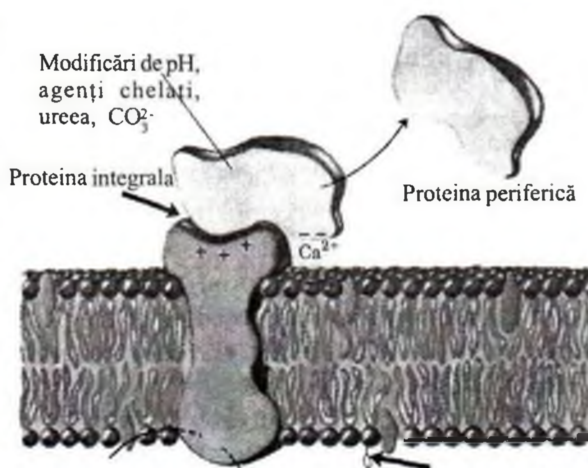


Figura 5.5. ***Proteinele integrale şi periferice, ultimele sunt ataşate covalent la lipidele membranare – glicozilfosfatidilinozitol***

Conform ultimelor investigaţii, proteinele periferice, în majoritatea lor, sunt asociate la suprafaţa proteinelor integrale. Mai profund sunt studiate proteinele membranei eritrocitelor: *spectrina* are o cotă de 30% din masa proteinelor membranei eritrocitare şi e compusă din 2 lanţuri polipeptidice, ce formează o reţea de filamente pe suprafaţa internă a membranei eritrocitare. La generarea acestei reţele participă activ şi o altă proteină mai puţin studiată. Reţeaua contribuie la formarea şi menţinerea formei concave a eritrocitului şi, concomitent, admite unele deformări la trecerea lui prin capilarele înguste.

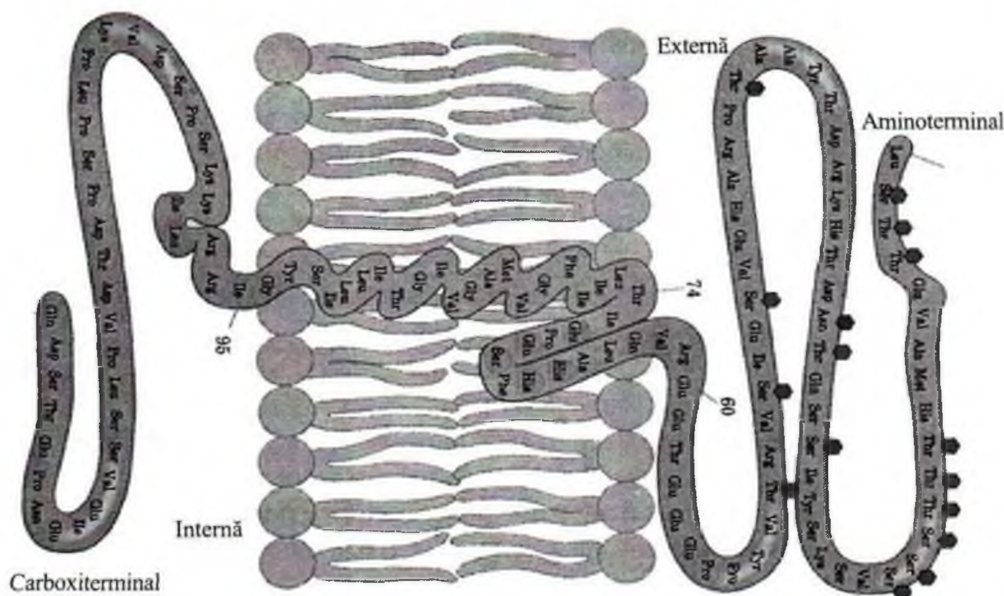


Figura 5.6. ***Secvenţa aminoacidică şi localizarea transmembranară a glicoforinei A eritrocitare. Un domeniu hidrofil, cu resturi de glucide, este aranjat în exteriorul membranei, iar celalalt – in partea interioară. Hexagonele reprezintă tetrazaharide (conţin cîte două molecule de acid sialic). Segmentul hidrofob format din 19 resturi aminoacidice (75-93) se aranjează în formă de a -spirală, traversînd stratul bilipidic***

Glicoforina – proteina transmembranară compusă dintr-un lanț polipeptidic, cu 131 resturi de aminoacizi, localizată preponderent în interiorul membranei, posedă 16 unități oligozaharidice și conține mai mult de 90% de acid sialic.

Glucidelor le revine mai mult de 60% din masa acestei proteine. Are *trei domenii.* Se consideră că un eritrocit conține $6x10^5$ molecule de atare proteină, funcția căreia nu e stabilită definitiv (fig.5.6).

Canalul anion pentru HCO_3^- și Cl^- reprezintă un dimer de proteină și ocupă 1/4 din toată proteina membranei. Are o masă de 95 kDa și e localizat pe ambele părți ale membranei. Moleculele proteice sunt la fel orientate spre centrul membranei (fig.5.7).

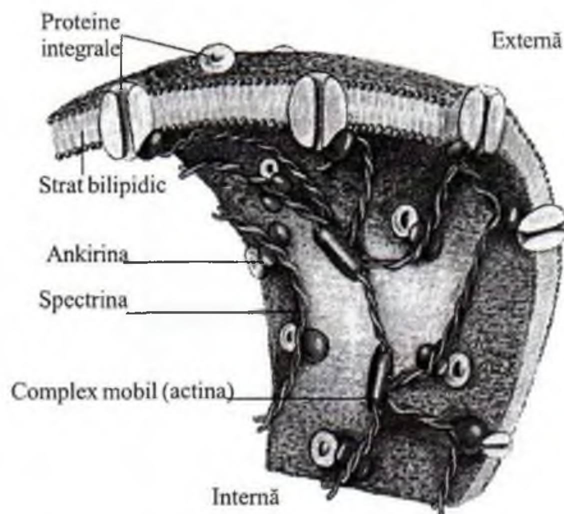


Figura 5.7. ***Canalul eritrocitar anion cluor-bicarbonat. Proteinele membranare sunt fixate covalent de proteinele citoscheletului (spectrina și ankirina) limitînd mobilitatea laterală. Ankirina covalent se leagă de catena palmitatului membranar. Spectrina, proteină filamentară, juncționează cu complexul actinei. Grație legăturei spectrinei membrana este protejată de deformație***

Studiul roentgenostructural a determinat structura tridimensională a proteinelor integrale membranare. Cercetările membranei purpurii a bacteriilor localizate în mediul salin i-au permis lui R.Henderson și N.Unwin să reconstituie configurația tridimensională a acestei proteine membranare, care constă în următoarele: membrana e specifică, conținînd bacteriorodopsină, o proteină cu masa de 25 kDa, ce transferă energia luminii în gradientul protonic transmembranar, utilizat pentru sinteza ATP (fig.5.8).

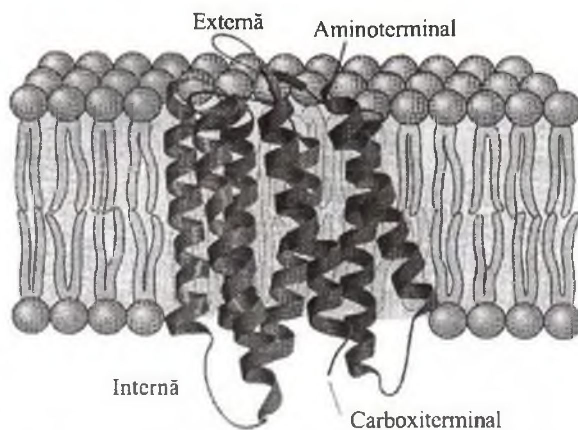


Figura 5.8. ***Bacteriorodopsină – aranjarea spațială în membrană. Catena polipeptidică prezintă 7 α-spirale hidrofobe în care fiecare din ele traversează stratul bilipidic perpendicular, formînd clastere, cu componenta acil a lipidelor membranare. Pigmentul retinal este în contact cu unele segmente ale acestor α-spirale***

Proteinele acestei membrane conțin 7 α-spirale fixate rigid, ce cad perpendicular pe suprafața membranei, ocupînd în lățime 45Å. Spațiul dintre moleculele proteice este completat cu bistrat lipidic. E posibil ca acest principiu de organizare să fie utilizat în organizarea altor proteine integrale.

În membranele celulelor de eucariote se conțin de la 2 pînă la 10% de *glucide* în formă de glicolipide și glicoproteine. Glicolipidele sunt compuși ai sfingozinei, cu unul sau mai multe resturi de zaharuri. Glicoproteinele, în membrane, sunt fixate prin una sau mai multe catene glucidice cu catenele serinei, treoninei sau asparaginei, prin N-acetilglucozamină sau N-acetilgalactozamină. Studiile efectuate au confirmat că în toate celulele mamiferelor studiate resturile de zahăr în membranele plasmatice se localizează pe partea lor exterioară (fig.5.9). Termenul *glicocalixul* este utilizat pentru accentuarea unei zone periferice de pe suprafața majorității celulelor eucariote saturate de glucide. Mai frecvent se întîlnesc: galactoza, manoza, fucoza, galactozamina, fucozamina, acidul sialic. Glucidele sunt covalent legate de proteine, situate pe suprafața celulei, și de unele molecule lipidice din monostratul lipidic exterior.

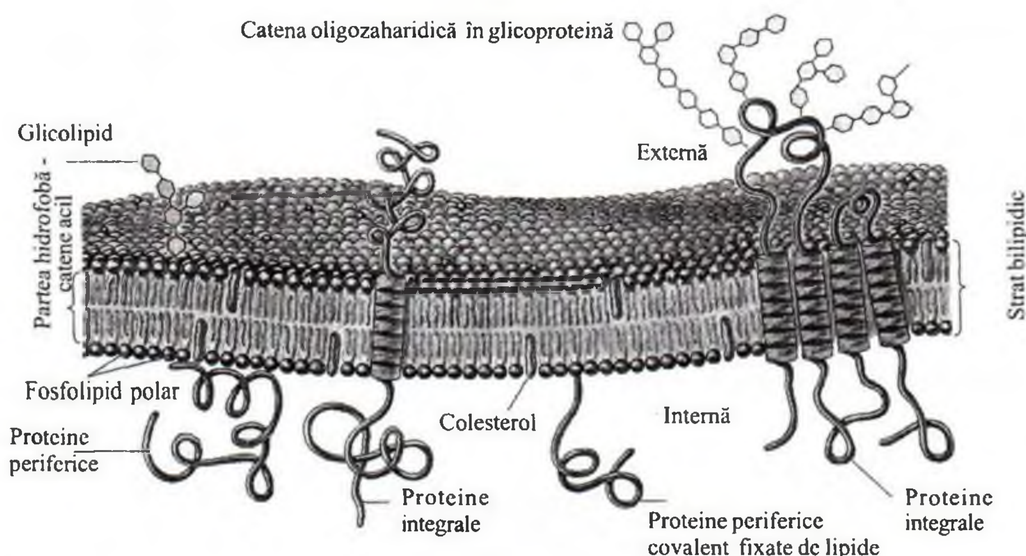


Figura 5.9. ***Modelul membranar fluido-mozaic Singer-Nicolson***

Grupele glucidice servesc probabil pentru orientarea glicoproteinelor în membrane. Posedînd proprietăți hidrofile pronunțate, resturile de glucide din glicoproteine și glicolipide trebuie să fie situate pe suprafața membranei, dar nu în faza hidrocarbonată. Cota valorii energetice pentru înglobarea lanțului ologozaharidic în mediul hidrofob e destul de înaltă. De aceea funcționează o anumită barieră în calea liberă a glicoproteinelor membranei.

Componentele glucidice ale glicoproteinelor membranare favorizează menținerea asimetriei membranelor biologice. Glucidele joacă un rol important în stabilizarea spațială a structurii glicoproteinelor. Lanțurile glucidice permit proteinelor transmembranare

să se ancoreze şi să se deplaseze într-un mod anumit în membrane, fapt ce exclude detaşarea proteinelor de membrane.

Glucidele de pe exteriorul celulei au funcția de identificare intercelulară, de formare a țesuturilor, de detectare a celulelor străine sistemului imun. Anume glucidele oferă posibilități potențiale pentru crearea multiplelor structuri diferențiate. Numărul impunător de variante poate fi explicat prin:

1) asocierea între ele a monozaharidelor prin oricare hidroxil al lor;

2) racordarea la C_1 poate fi α- sau β- configurație;

3) ramificația multiplă (din 3 monozaharuri se pot obține 1000 şi mai bine de trizaharide-structuri mult mai numeroase decît sunt posibile din 3 aminoacizi).

Glucidele dirijează şi interacțiunea intercelulară. Transportul proteinelor membranare în locusurile necesare este de asemenea determinat de glucide.

Fluiditatea

Membranele biologice nu sunt structuri statice, ci dimpotrivă. Atît lipidele, cît şi multe proteine membranare se rotesc permanent în jurul osiei sale, perpendicular planului bistratului (*difuzia de rotație*). Ambele structuri circulă în direcție laterală. Experimental s-a demonstrat că molecula de lipid se deplasează de la un capăt al celulei la celălalt (celula bacteriană) timp de 1 sec. Proteina din membrană poate difunda la o depărtare de cîțiva microni într-un minut. O astfel de mişcare e denumită *difuzie laterală*. Spre deosebire de lipide, proteinele sunt foarte neomogene în raport cu această difuzie. Unele sunt mobile la fel ca şi lipidele, altele, practic, staționează. Mobilitatea neînsemnată a unor proteine e cauzată de fixarea lor în structurile citoplasmatice submembranare.

Viscozitatea membranelor e de 100 de ori mai mare decît a apei şi e aproape de viscozitatea uleiului de măsline. Migrarea spontană a lipidelor de pe o suprafață pe alta are loc foarte încet, comparativ cu circularea lor în planul membranei. Această migrare e denumită *difuzie transversală*. O moleculă lipidică poate difuza o dată la două săptămîni şi mai rar. Difuzia moleculelor în planul membranei, denumită *difuzie laterală*, e mult mai frecventă (10^7 ori într-o secundă). Recent, aplicînd metoda rezonanței electronice paramagnetice, s-a observat că circularea unei molecule de fosfolipid de pe o parte a bistratului pe cea opusă are loc o dată la cîteva ore. Ea necesită o durată de timp de 10^9 ori mai mare decît difuzia la distanță similară în direcția laterală.

Bariera energetică la difuzia transversală a moleculelor proteice e mai durabilă decît a lipidelor, deoarece proteinele conțin cu mult mai multe fragmente polare. Practic, difuzia aproape că nu se manifestă, ceea ce determină o duritate mai mare a asimetriei membranei.

Majoritatea membranelor sunt asimetrice, adică suprafețele lor posedă valori diferite. Această asimetrie se manifestă prin următoarele trăsături caracteristice:

1) Suprafețele internă şi externă ale membranelor plasmatice din celulele bacteriene sau animale diferă după componența lipidelor polare. De exemplu, partea internă a stratului lipidic din membranele eritrocitelor omului conține fosfatidiletanolamină şi fosfatidilserină, pe cînd cea externă – fosfatidilcholină şi sfingomielină. Sensul biologic constă în asimetria lipidică ce asigură orientarea precisă a proteinelor membranare în bistrat.

2) Unele sisteme de transport în membrane funcționează numai într-o singură direcție – transferul Na^+ din celulă în mediu, iar K^+ – în celulă, utilizînd energia hidrolizei ATP. "Pompa" dată nu funcționează în direcție opusă.

3) Pe suprafața externă a membranelor plasmatice sunt situate multiple grupe oligozaharidice, ce reprezintă capul glicolipidelor și catenele laterale ale glicoproteinelor. Pe partea internă a acestor membrane ele, practic, lipsesc. Asimetria glicolipidică este absolută. Rolul asimetriei nu este stabilit definitiv, însă comunicarea intercelulară este determinată de aceste structuri.

Ce factori reglează fluiditatea membranelor?

Evident că în bistratul membranar catenele acizilor grași din moleculele lipidelor se află ori în stare rigidă, sistematizată și relativ haotică, sau în stare fluidă. În stare reglementată toate legăturile C-C sunt în trans - conformație, în cea fluidă - cis. La creșterea temperaturii, mai înaltă decît cea de topire, are loc transformarea stării din solidă în lichidă.

Reglatorul principal la procariote este lungimea catenei și gradul de nesaturare a restului acil. La celulele eucariote reglatorul-cheie al fluidității e colesterolul: fiecărei molecule de fosfolipid îi revine o moleculă de colesterol. Situîndu-se între catenele acil, colesterolul, pe de o parte, evită cristalizarea și fuziunea lor, iar pe de alta – blochează mobilitatea excesivă a catenelor acil, micșorînd fluiditatea membranelor. Datorită acestui efect contrar, colesterolul menține fluiditatea membranelor la un nivel mediu.

Molecula colesterolului e orientată astfel: grupa -OH se situează în apropierea capului polar al fosfolipidului, pe cînd inelul steroid plat parțial imobilizează fragmentele catenelor hidrocarbonate, ce au contact nelimitat cu grupele polare.

Colesterolul inhibă circulația fazică în gel sau cristale legată de modificările de temperatură din lichid. Colesterolul mărește duritatea mecanică a membranelor. Lipsa lui din lichidul de cultivare al celulelor conduce la liza celulelor, iar surplusul de colesterol contribuie la supraviețuirea lor.

Ce model, în linii generale, ar elucida *organizarea membranelor biologice*? E utilizat *modelul fluido-mozaic*, propus în 1972 de savanții J.Singer și G.Nicolson. Conform acestui model, membranele reprezintă soluții bidimensionale, în anumit mod orientate, ale proteinelor globulare și ale lipidelor (fig.5.9).

Tezele principale sunt:

1) majoritatea fosfo- și glicolipidelor formează bistrat, avînd un rol dublu: constituie solvenți simultani pentru proteinele integrale din membrană și barieră a permeabilității;

2) o mică parte din lipidele membranare se leagă specific cu anumite proteine membranare și, incontestabil, este necesară pentru funcționarea acestora;

3) proteinele membranei difundează liber în matricea lipidică în direcție laterală, dar nu pot transversa, deplasîndu-se de pe suprafețe;

4) la temperatura normală a celulei, matricea se află în stare fluidă, fiind asigurată de un anumit raport dintre acizii grași saturați și cei nesaturați în cozile hidrofobe ale lipidelor polare, precum și de prezența colesterolului;

5) suprafața proteinelor integrale incluse în membrană conține R-grupe hidrofobe ale resturilor de aminoacizi, datorită cărora proteinele devin solvente în partea centrală

hidrofobă a bistratului. Pe suprafaţa periferică a celulelor se postează grupe hidrofile, care adiţionează la capurile polare hidrofile, ce conduc sarcina electrică în baza forţelor electrostatice;

6) proteinele integrale (enzimele, proteinele transportatoare) manifestă acţiune numai în cazul în care sunt situate în partea hidrofobă a bistratului, unde capătă o anumită configuraţie spaţială, necesară pentru activitate. De menţionat că nici între moleculele lipidice, nici între cele proteice şi lipidice nu se formează legături covalente. Proteinele periferice plutesc la suprafaţa bistratului, pe cînd cele integrale, aidoma unor gheţari, se scufundă în stratul hidrocarbonat mediu;

7) capacitatea proteinelor membranei de a se deplasa lateral poate fi redusă în funcţie de atracţia între proteinele legate funcţional, cu formarea unor clastere, ce, în final, conduc la o repartiţie mozaică a proteinelor în bistratul lipidic fluid.

Acest fenomen poate sta la baza aşa-numitului efect *caping* – deplasarea anumitelor proteine membranare în zone specifice ale membranei, atestată la unele tipuri de celule în decursul ciclului vital.

Modelul dat se consideră cel mai adecvat. E descrisă, în general, membrana plasmatică – plasmalema, ce contribuie la menţinerea homeostazei celulare.

Din *membranele Golgi* deviază lizozomii, adică organitele ce conţin membrană ordinară unică şi un ansamblu complet de enzime pentru scindarea, practic, a tuturor compuşilor celulei. Aceştia constituie organite de necesitate vitală. Absenţa unor enzime lizozomale specifice, în consecinţă, se soldează cu afecţiuni grave. Minimumul necesar pentru descompunere este transferat în lizozomi, unde este scindat pînă la componentele indispensabile transferate în citoplasmă. La lezarea integrităţii membranelor lizozomale, enzimele pătrund în celulă şi sunt capabile s-o distrugă, provocînd autoliză.

Produsele rezultante părăsesc uşor lizozomul sau sunt utilizate chiar de el. În membrana lizozomală e prezentă o proteină de transport specializată, care utilizează energia de hidroliză a ATP pentru pomparea ionilor H^+ în cavitatea organitelor şi menţinerea pH=5. Membrana mai conţine proteine acceptori pentru substanţe specifice sau bule de transport (granule). În lizozom substanţa pătrunde mai uşor decît o părăseşte, devenind mai hidrofilă (adiţionînd H^+) şi mai puţin capabilă să părăsească bistratul.

Membranele mitocondriale examinate mai sus, posedînd membrane duble, formează spaţiu intermembranar şi spaţiu intermatriceal mitocondrial.

Dacă membrana plasmatică este relativ impermeabilă, apoi cum pătrund în celulă majoritatea moleculelor? De ce este asigurată selectivitatea transportului transmembranar, schimbul perpetuu între mediile intra- şi extracelular? Se cere un răspuns complet pentru a conştientiza cum membrana celulară controlează homeostazia biochimică a mediului intracelular, asigurînd adaptarea celulelor la condiţiile extrem de variate ale mediului extern.

SISTEMELE TRANSPORT

Transportul prin membranele celulare se realizează prin două tipuri de sisteme: sisteme de microtransport şi sisteme de macrotransport. Ultimele sisteme sunt proprii substanţelor cu masa moleculară mare şi se realizează, prin mecanisme specifice, endo şi exocitoza, descrise în cursul de histologie.

Sistemele de transport antrenează transportul transmembranar al substanţelor cu masa moleculară mică prin două mecanisme:

- transportul pasiv care se realizează prin difuziune, osmoză, echillibrul Donnan;
- transportul activ asigurat de pompe active ce se realizează în contragradient de concentraţie şi prin translocare de grup.

Transportul pasiv

Unele substanţe, de exemplu gazele, pătrund în celulă prin difuzie transmembranară după gradientul electrochimic, fără utilizare de energie. Viteza acestei difuzii a solvenţilor este determinată de temperatura moleculelor, gradientul de concentraţie transmembranar al substanţelor şi solubilitatea lor în stratul hidrofob membranar. Solubilitatea este invers proporţională cu numărul legăturilor de hidrogen ce trebuie distruse ca substanţa solubilă în mediul apos să fie inclusă în stratul hidrofob. Electroliţii insuficient solubili în lipide nu formează cu apa legături de hidrogen, dar posedă membrană apoasă, formată ca rezultat al interacţiunii electrostatice. Dimensiunile ei sunt direct proporţionale cu densitatea sarcinii electrolitului. Cu cît densitatea sarcinii electrolitului este mai mare, cu atît lui îi aparţine o membrană apoasă mai majoră şi, în final, se caracterizează cu o viteză a difuziei mai mică. De exemplu: ionul de Na^+ posedă o densitate a sarcinii mai mare decît ionul de K^+ şi, deci, Na^+ hidratat are dimensiuni mai mari decît K^+ şi, în consecinţă viteza lui de difuzie pasivă va fi mai mică.

În membranele biologice, spre deosebire de bistraturile sintetice, sunt amplasate canale transmembranare ionice de natură proteică. Viteza de transport prin ele este dependentă de diferenţa de concentraţie – de la o concentraţie mai mare spre o concentraţie mai mică. Canalele permeabile pentru cationi au diametrul egal aproximativ cu 5-8 nm şi conţin grupe încărcate negativ. Conductibilitatea lor e dependentă de mărimea, gradientul de hidratare şi densitatea sarcinii ionului respectiv.

Activitatea acestor canale ionice este reglată în membranele celulelor nervoase de neuromediatori. Unii ioni reglează activitatea canalului permeabil pentru alt ion. La micşorarea concentraţiei de Ca^{++}, în lichidul extracelular se majorează permeabilitatea şi difuzia Na^+, ce conduce la depolarizarea membranei şi generarea impulsului nervos. Canalele sunt deschise numai pentru o anumită durată de timp, ce este determinată de fixarea unui ligand specific de receptor. În alte cazuri, canalele se deschid la modificările potenţialului membranar. Unele microorganisme pot sintetiza molecule organice mici – *ionofori*, care realizează transferul navetă al ionilor prin membrane. Aceşti ionofori conţin centre hidrofile, ce fixează anumiţi ioni. Periferia acestor centre prezintă o membrană hidrofobă, ce permite acestor molecule uşor să se dizolve în membrană şi să difundeze prin ea. Alţi ionofori, ca polipeptida *gramicidina*, formează canale proteice. Unele toxine microbiene (*toxina difterică*) şi componentele complementului seric activ pot forma pori în membranele celulare, prin care se pot deplasa şi macromoleculele.

Mecanismele schematice de transfer transmembranar sunt redate în fig. 5.10.

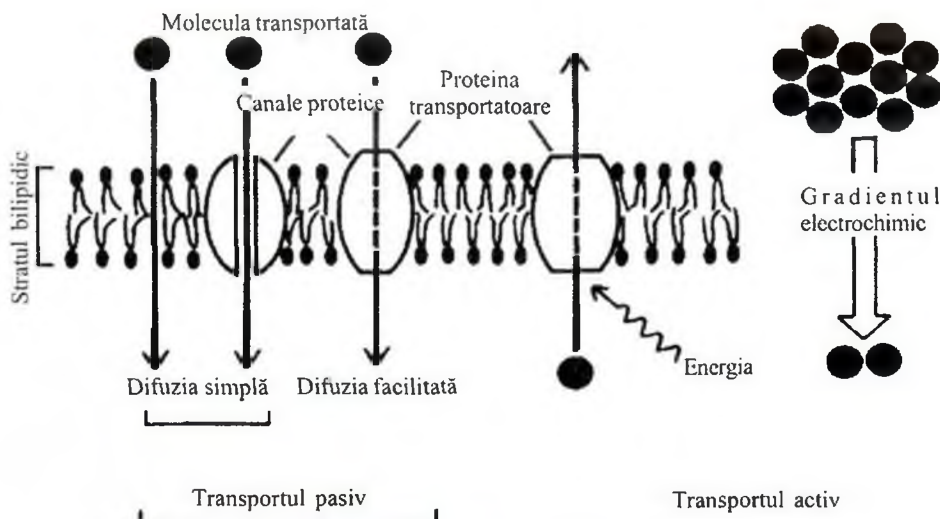


Figura 5.10. ***Mecanismele schematice ale transferului transmembranar***

Constatăm că difuzia substanţelor e cauzată de:

1. Gradientul de concentraţie transmembranar. Solvenţii se deplasează spre micşorarea concentraţiei lor.
2. Diferenţa transmembranară a potenţialului electric. Substanţele dizolvate se deplasează spre soluţia cu sarcina antipodă.
3. Coeficientul permeabilităţii membranei pentru substanţa în cauză.
4. Gradientul de presiune hidrostatică pe membrană. La creşterea presiunii se accelerează viteza de contact între molecule şi membrană.
5. Temperatură. Temperatura ridicată amplifică viteza particulelor şi posibilitatea de interacţiune între ele şi membrană creşte.

Difuzia mediată (facilitată) şi transportul activ. Sistemele de transport pot fi caracterizate după numărul şi direcţia moleculelor transferate (fig.5.11). În sistemul *uniport* are loc transferul moleculelor de un tip anumit în ambele direcţii. În sistemul *cotransport* transferul unei substanţe solubile este însoţit de transferul, împreună sau în succesiune, a unei cantităţi echivalente ale altei substanţe. În caz de *simport,* ambele substanţe se deplasează în aceeaşi direcţie (H^+-zaharuri, Na^+- zaharuri, Na^+ - aminoacizi). În *antiport* substanţele se transferă în direcţii opuse (Na^+– în celulă, Ca^{2+} – din celulă). Moleculele care nu pot singure traversa bistratul lipidic sunt transferate de proteine specifice. Un aşa transfer se realizează pe două căi: prin difuzie mediată sau transport activ, cu utilizarea unor căi specifice de transport. Ambele sisteme sunt asemănătoare cu reacţiile dintre enzimă şi substrat, însă se realizează fără formarea

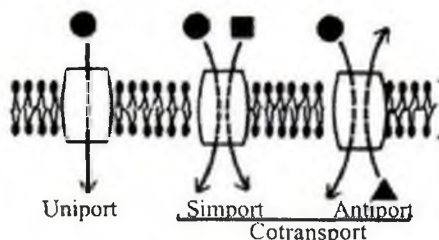


Figura 5.11. ***Redarea schematică a tipurilor sistemelor de transport***

legăturilor covalente. Se deosebesc prin faptul că: 1) difuzia mediată se realizează în ambele direcții, pe cînd transportul activ, de obicei, numai într-o direcție;

2) transportul activ are loc contra gradientului electric sau chimic și necesită utilizare de energie.

Difuzia mediată

S-a constatat că unele substanțe difundează prin membrană după gradientul electrochimic mult mai rapid decît se poate considera, reieșind din dimensiunile, densitatea și coeficientul de solubilitate ale acestor particule (fig.5.12). Sistemele respective sunt stereospecifice și nu necesită energie. Se cunoaște că proteinele membranare sunt localizate asimetric, au anumit grad de stabilitate și deplasarea lor transversală prin membrană are loc în exclusivitate și nu poate determina acest mecanism de difuzie. Acest proces se datorează unor modificări conformaționale ale proteinelor (permeaze) de tipul «ping-pong» (fig.5.13).

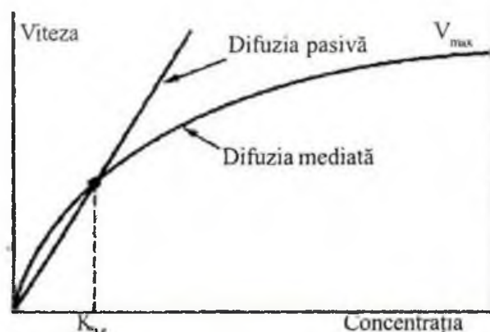


Figura 5.12 *Cinetica difuziei pasive și mediate. În difuzia pasivă viteza transportului e proporțională cu concentrația substanțelor respective. În difuzia mediată se observă fenomenul de saturație.*

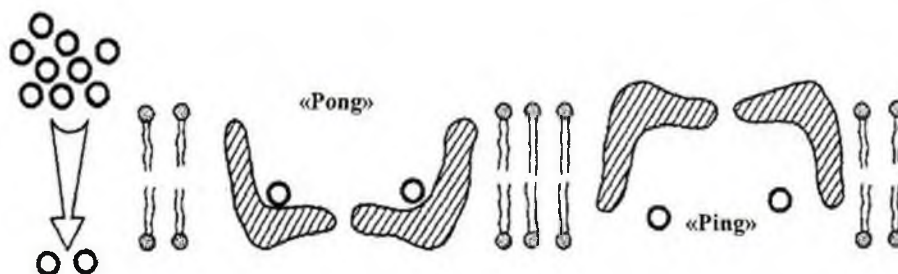


Figura 5.13. *Mecanismul «ping-pong»*

Procesul este reversibil și rezultanta este cauzată de gradientul de concentrație. Viteza cu care substanța solubilă se va deplasa în celulă e dependentă de:

1. gradientul de concentrație transmembranar;
2. numărul de transportatori;
3. viteza de fixare a substanței cu transportatorul;
4. viteza modificărilor conformaționale în ambele stări ale transportatorului. Transportul moleculelor prin intermediul transportatorului necesită un nivel de energie liberă mult mai mic.

În *difuzia simplă* moleculele hidrofile pierd învelișul apos. Acest proces este înalt endergonic, avînd un ΔG (energie liberă) foarte înalt (fig. 5.14a). Proteina transportătoare reduce energia liberă pentru difuzia transmembranară (fig. 5.14b). Procesul este mediat prin interacțiuni necovalente, cu pierderea învelișului apos, ca rezultat al ruperii legăturilor de hidrogen, promovînd transportul moleculelor hidrofile.

Hormonii reglează difuzia mediată prin reglarea numărului de transportatori posibili (insulina – glucoza, glucocorticoizii – aminoacizii etc.)

Transportul activ se realizează cu consum de energie, ca rezultat al modificărilor în echilibru termodinamic. Sursa de energie este hidroliza ATP, procesul de transfer al electronilor, lumina. Menținerea gradientului electrochimic joacă un rol decisiv în sistemele biologice și este cuplată cu utilizarea a 30-40% din energia captată de celule.

Căile de transport activ sunt: a) transportul în contragradient de concentrație și b) transportul prin translocare de grup.

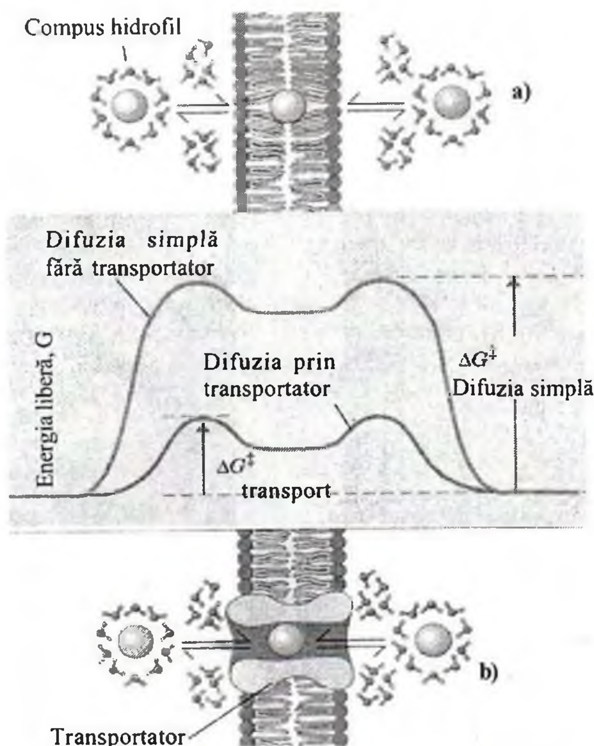
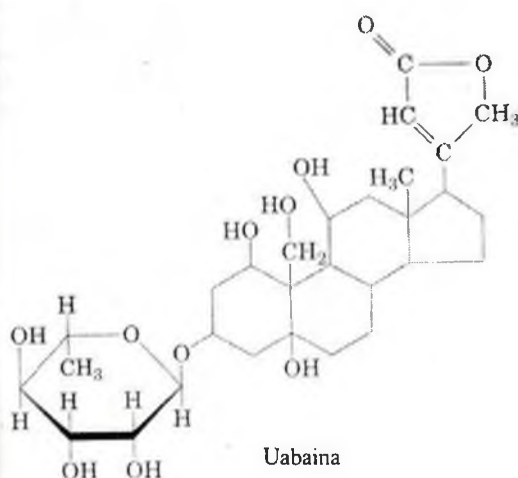


Figura 5.14. ***Energia liberă la transportul moleculelor hidrofile prin membranele biologice: a) difuzie simplă si b) difuzie prin transportator***

În cazul transportului în contragradient de concentrație o substanță poate trece de la o concentrație scăzută (Na^+) a unui compartiment (celulă) la o concentrație mai crescută a altui compartiment – contrar concentrației de K^+. Pompa care menține acest gradient este ATP-aza activată de ionii de Na^+ și K^+.



ATP-aza este o proteină integrală constituită din două subunități de tip α, cu masa moleculară de 94kDa și două de tip β, cu masa 50kDa, unde α subunitate are rol catalitic. Activitatea ei necesită fosfolipide. Centrele catalitice pentru ATP și Na^+ sunt aranjate pe partea citoplasmatică a membranei, centrul catalitic pentru K^+ – în exteriorul membranei (fig.5.15). Uabaina inhibă activitatea enzimei, fixîndu-se de fragmentul extracelular. Această inhibiție poate fi anihilată parțial prin K^+ extracelular.

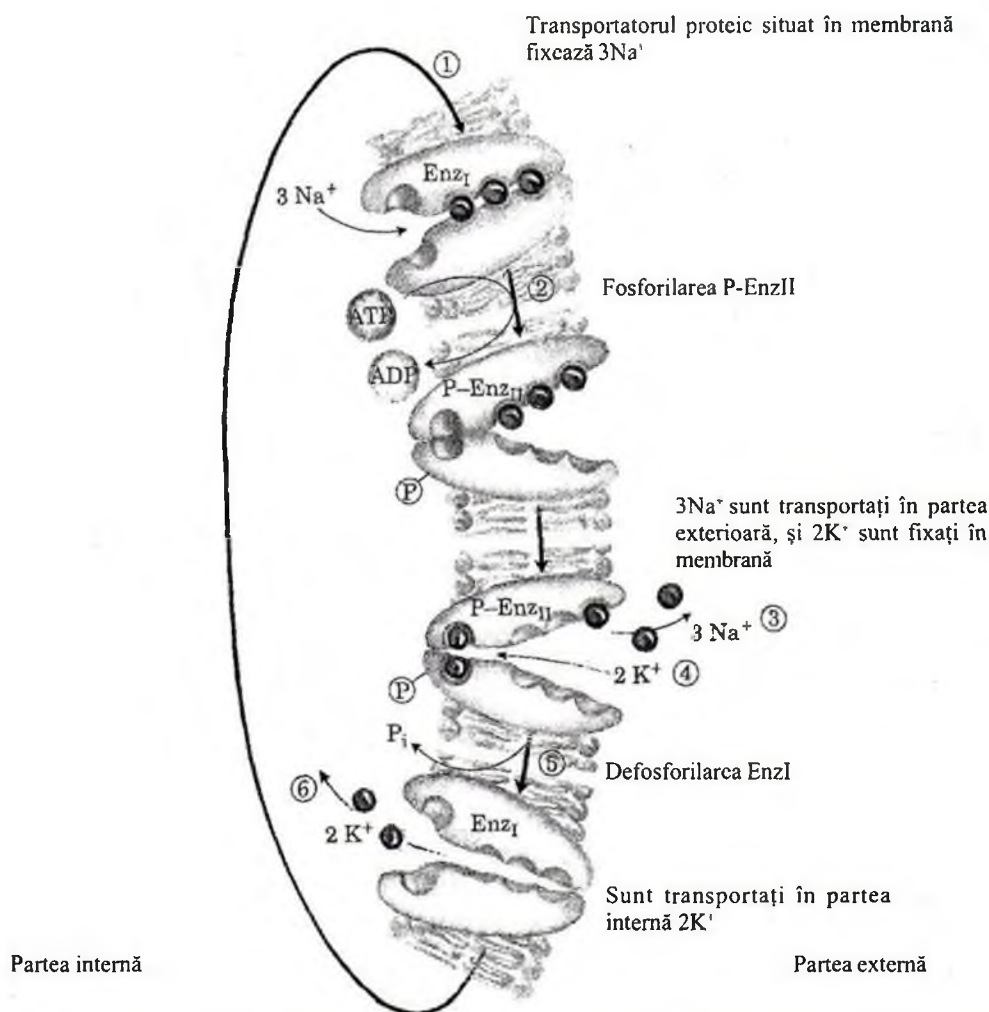


Figura 5.15. ***Mecanismul de transport al ionilor de Na^+ şi K^+,de Na^+-K^+-ATPaza. 1) Pe suprafața internă a transportatorului proteic, aranjat în membrană, sunt legați $3Na^+$. Na^+ are o afinitate majoră față de subunitatea mare a transportorului. Această subunitate posedă şi site-ul de fixare a ATP-ului.2) Fosforilarea modifică conformația moleculei proteice şi micşorează afinitatea față de Na^+, care este expulzat în exteriorul membranei. 4) K^+ exterior are o afinitate majoră față de porțiunea extracelulară a subunității mari.5) Enzima este defosforilată, reducînd afinitatea față de ionii de K^+.6)K^+ este transferat în interiorul celulei. Proteina transportatoare participă la un nou ciclu de transport al Na^+ şi K^+***

Transportul prin translocare de grup implică formarea unui derivat al substanței inițiale. Derivatul format prin utilizarea ATP traversează membrana în contragradient de concentrație. Se consideră că astfel de transfer se realizează în cazul compuşilor glucidici (hexoze), cu participarea unei fosfotransferaze, ce transferă gruparea fosfat pe molecula de hexoză (fig.5.16a).

Sistemele de transport discutate sunt sumar redate in fig.5.16b.

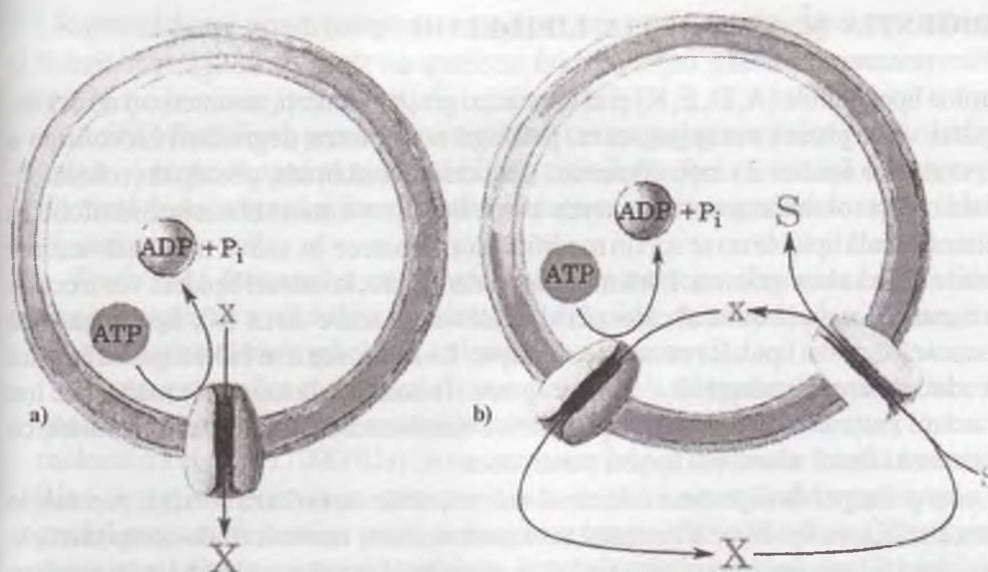


Figura 5.16a. ***Două tipuri de transport activ: a) în transportul activ primar, energia realizată prin hidroliza ATP-ului este utilizată în transportul contra gradientului electrochimic. b)în transportul activ secundar ionul X este transportat activ. Energia necesară pentru deplasarea cotransportatorului, ionul S este asigurată de mişcările ionului X***

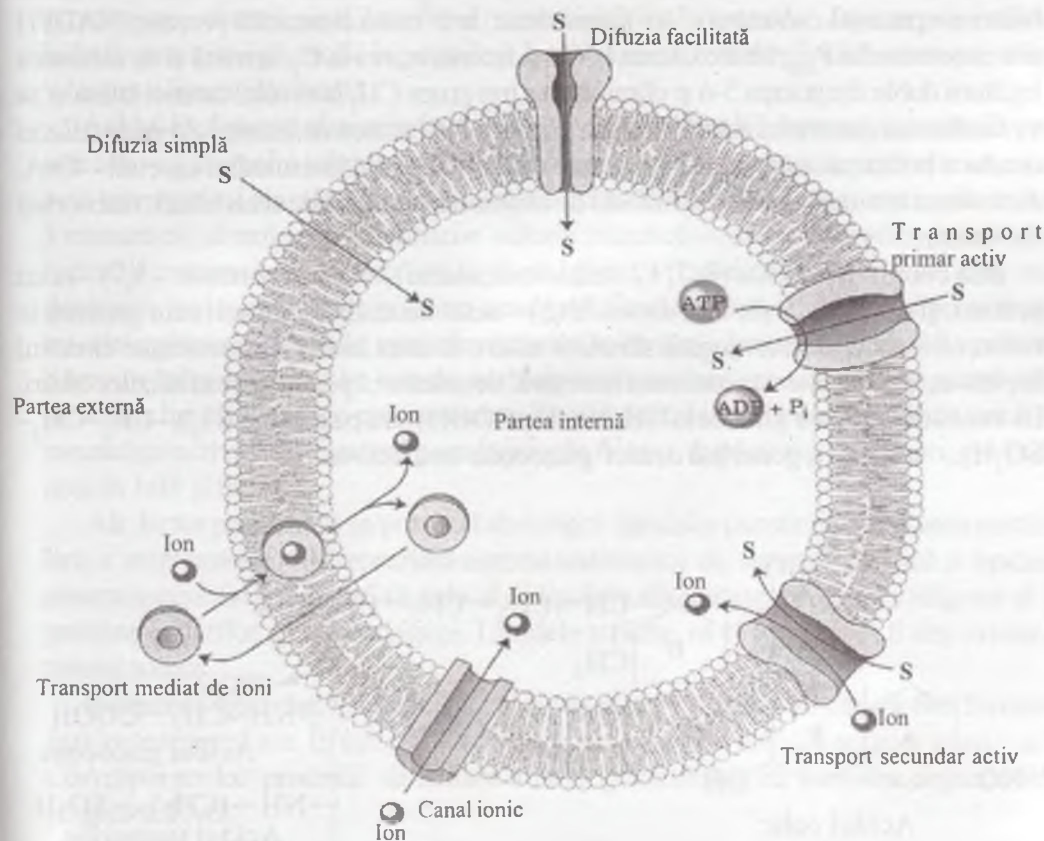


Figura 5.16b. *Tipurile de transport*

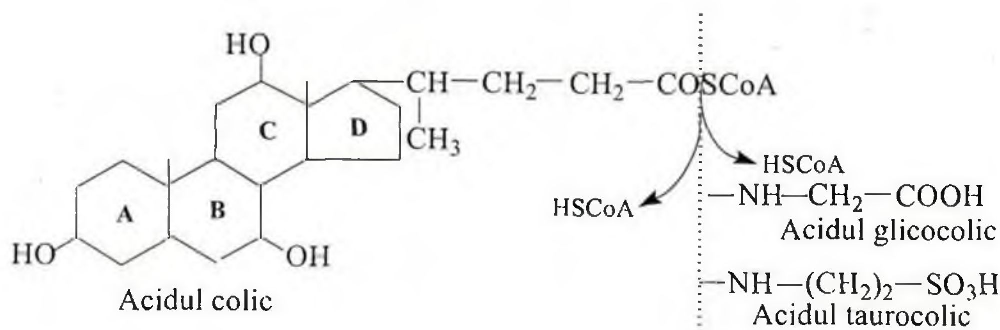
DIGESTIA ŞI ABSORBŢIA LIPIDELOR

Funcţionarea normală a organismului necesită un consum obligatoriu minim de vitamine liposolubile (A, D, E, K) şi al unor acizi graşi nesaturaţi, nesintetizaţi de celule. Digestia e un proces complex, care, pe lîngă necesitatea degradării hidrolitice a componentelor lipidice din raţia alimentară (trigliceride, fosfolipide, glicolipide, colesterol), mai solicită şi solubilizarea, menţinerea în mediul apos a unor substanţe hidrofobe.În cavitatea bucală lipidele nu se supun modificărilor, deoarece în salivă nu există enzime capabile să scindeze grăsimi. Fără modificări deosebite, la maturi lipidele vor trece şi prin stomac. La copiii mici, al căror pH al sucului stomacal e circa 5.0, lipaza gastrică favorizează digestia lipidelor emulgate din lapte. La o utilizare mai îndelungată a laptelui se produce o sinteză adaptivă a acestei lipaze. În stomacul oamenilor maturi are loc o scindare parţială a complexelor lipoproteice membranare din celulele alimentelor, ce favorizează efectul ulterior al lipazei pancreatice.

Locul principal de digestie e intestinul subţire, unde se creează condiţii favorabile pentru emulgarea lipidelor. Chimusul acid stomacal este neutralizat de componentele bilei – acizi biliari conjugaţi şi sărurile lor, ce stimulează emulgarea lipidelor în asociere cu acţiunea peristaltismului. La emulgare participă şi enzimele.

Acizii biliari reprezintă produsul final al metabolismului colesterolului şi, după structură, constituie derivaţi ai acidului colanic (C_{24}). Enzima-cheie în sinteza acizilor biliari o reprezintă *colesterol-7-α-hidroxilaza*; activitatea ei necesită prezenţa NADPH şi a citocromului P_{450}. Hidroxilarea la C_{12} şi izomerizarea la C_3, urmată şi de saturarea legăturii duble din poziţia 5-6 şi eliminarea a trei grupe CH_3 la nivelul catenei laterale, se va finaliza cu generarea acizilor biliari primari. Activitatea *colesterol-26-hidroxilazei* conduce la formarea *propionil-CoA*, care va fi utilizat prin intermediul succinil – CoA. Activitatea enzimei-cheie este inhibată de majorarea nivelului de acizi biliari, reabsorbiţi din intestin.

Bila conţine *acid colic* (3, 7, 12 - trihidroxicolanic), *chenodezoxicolic* (3,7) – acizi primari, şi *dezoxicolic* (3, 12), *litocolic* (3) – acizi secundari. Ultimii sunt generaţi în colon, ca rezultat al deconjugării sărurilor biliare de către bacteriile intestinale: circuitul hepato-entero-hepatic va economisi necesarul de colesterol pentru sinteza acizilor biliari. Ei sunt conjugaţi cu glicocolul (H_2N-CH_2-COOH) sau cu taurina (H_2N–CH_2–CH_2–SO_3H), - respectiv, generînd *acidul glicocolic* sau *taurocolic*.



Acidul colic

Raportul dintre aceşti compuşi conjugaţi e dependent de caracterul raţiei alimentare. O raţie bogată în glucide măreşte conţinutul conjugatelor glicinei; în proteine – ale taurinei.

Acizii biliari liberi, precum şi sărurile lor, cei conjugaţi conţinînd grupări hidroxilice polare şi grupe cu sarcină negativă (COO^-, SO^-_3), conferă moleculelor caracter hidrofil, dizolvîndu-le în apă şi formînd soluţii micelare, prin agregarea unui număr relativ mic de molecule.

Fosfatidele formează uşor agregate micelare mixte cu alte lipide care, la rîndul lor, au capacitatea de a solubiliza alte categorii de lipide pronunţat polare (monogliceride) sau mai puţin polare (trigliceride, colesterol, acilcolesterol).

Asupra grăsimilor emulsionate acţionează hidrolazele pancreatice specifice. *Lipaza* neactivă devine activă în lumenul intestinal, formînd un complex cu *colipaza* (masa moleculară egală cu 10000Da) în raport molar 2:1, ce înlesneşte modificarea pH de la 9 la 6 şi previne denaturarea enzimei. Viteza catalizei nu este influenţată substanţial de gradul nesaturării acizilor graşi şi lungimea catenei; măreşte viteza Ca^{++}, formînd cu acizii graşi eliberaţi săpunuri insolubile, fapt ce preîntîmpină efectul lor inhibitoriu şi deplasînd reacţia spre hidroliză.

Fofosfolipidele sunt scindate de fosfolipazele pancreatice de o specificitate carboxiesterazică, cu formarea lizofosfatidelor ce au proprietăţi detergente foarte pronunţate, contribuind la solubilizarea lipidelor în intestin. *Lipaza pancreatică* hidrolizeaza triacilglicerolii în poziţiile 1,3, cu formarea 2-monogliceridelor asupra cărora va acţiona lipaza intestinală.

Acidul fosforic se absoarbe în stare de sare de Na^+ sau K^+, baze azotate sub formele sale active. Glicerolul solubil, de rînd cu acizii graşi cu o catenă mică, părăseşte intestinul prin intermediul circulaţiei portale. Acizii graşi cu o catenă mare şi monogliceridele formează cu sărurile acizilor biliari o soluţie micelară – nucleu hidrofob – membrană hidrofilă compusă din acizi biliari şi fosfolipide. Micelele sunt de 100 ori mai mici decît cele mai mici bule de grăsime emulgată. Graţie difuziei micelare şi pinocitozei, micelele pătrund în spaţiile intervilozitare de la nivelul jejunului proximal şi se absorb. Sărurile biliare rămîn în lumen, participînd la solubilizarea şi transportul altor molecule lipidice. Abia în porţiunea distală a ileonului sărurile sunt absorbite printr-un mecanism activ. Prin sistemul portal ajung în ficat şi, după unele remanieri, revin din nou în bilă şi intestin.

Alt factor primordial în procesul absorbţiei lipidelor constituie activitatea metabolică a enterocitelor. Ele reprezintă sisteme enzimatice de sinteză specifică a lipidelor pentru specia dată, care diferă radical de lipidele alimentare. Procesul e asigurat şi de prezenţa acizilor graşi endogeni. Lipidele străine, ca excepţie, pot fi depozitate în ţesutul adipos.

Resinteza lipidelor. Căile de sinteză ale lipidelor în enterocite decurg fără formarea fazelor intermediare. În sinteza TAG se formează forma activă a acizilor graşi – acil-CoA, apoi are loc procesul de acilare a monoglicerolului, cu formarea digliceridelor şi apoi a TAG.

Resinteza fosfolipidelor decurge, cu formarea acidului fosfatidic: din glicerol-3-fosfat, apoi acilarea lui. Moleculele lipidice reconstituite (TAG, FL), împreună cu colesterolul şi cantităţile mici de proteină, formează particule relativ stabile, numite *chilomicroni* (fig.5.17).Chilomicronii secretaţi, deplasîndu-se prin vasele chilifere şi sistemul limfatic, ajung în circulaţia sanguină. După o oră-două, la asigurarea suficientă cu lipide, se observă hiperlipidemia alimentară, cu un apex la 4-6 ore; peste 12 ore chilomicronii dispar din circulaţia sanguină. Care este soarta lor?

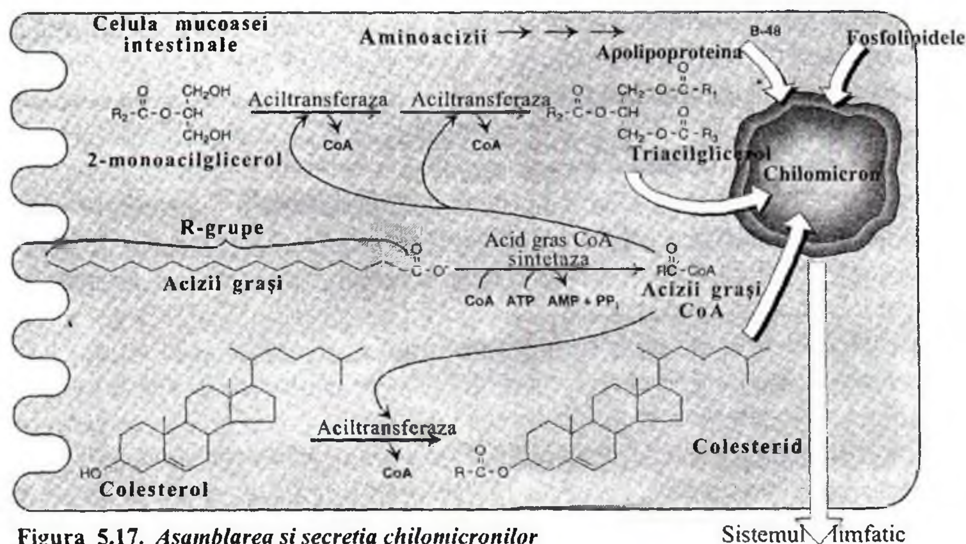


Figura 5.17. ***Asamblarea şi secreţia chilomicronilor***

Chilomicronii exceleazǎ liber din sînge în spaţiul intercelular al ficatului, unde sunt supuşi hidrolizei atît în interiorul, cît şi pe suprafaţa hepatocitelor. Chilomicronii nu pătrund în ţesutul adipos şi în celule. Ca atare, TAG se hidrolizează pe suprafaţa endoteliului capilarelor ţesutului adipos sub acţiunea *lipoproteinlipazei* (LPL), cu formarea acizilor graşi şi a glicerolului. O parte de acizi graşi pătrunde în interiorul adipocitelor, alta se fixează de albumina sîngelui şi se transportă prin sînge, glicerolul la fel părăseşte ţesutul adipos. Colesterolul, fosfolipidele, apolipoproteinele sunt transferate pe HDL (lipoproteine cu o densitate mare).

LPL este activată de *apolipoproteina C - II* primită în prealabil de la HDL, veritabile «rezervoare» de apo C. Acizii graşi eliberaţi sub acţiunea LPL pot fi catabolizaţi pe calea β-oxidării, cu generarea de energie, sau pot fi depozitaţi sub formă de TAG în ţesutul adipos. Alternativ, acizii graşi pot fi legaţi de albumina serică şi transportaţi spre alte ţesuturi.

LPL este sintetizată de celulele endoteliale capilare şi fixată pe suprafaţa lumenală a acestora prin intermediul heparan sulfatului. Sîngele nu conţine cantităţi mari de LPL. Însă prin adminisrarea de heparină, se observă desprinderea LPL de pe suprafaţa endoteliului şi clarifierea serului lactescent. Cantităţi mari de LPL se evidenţiază în ţesutul adipos, inimă, glanda mamară în lactaţie, plămîni, splină, rinichi, cu excepţia ficatului şi a creierului. Afinitatea LPL pentru TAG chilomicronilor diferă de la ţesut la ţesut.

Astfel, LPL din inimă are constanta Michaelis K_M de 10 ori mai mică decît enzima din țesutul adipos. Această diferență explică de ce în condiții de inaniție, cînd are loc diminuarea concentrației TAG, enzima miocardică rămîne saturată vizavi de substratul său, iar activitatea enzimei din adipocite scade, ceea ce va determina redistribuția TAG din țesutul adipos spre inimă, unde vor fi hidrolizați de LPL. Acizii grași rezultați vor fi utilizați în celulele miocardice ca material energetic.

S-a observat că LPL este produsă și de macrtofagele din intima arterelor. Datele experimentale obținute de unii autori demonstrează că LPL din macrtofage poate juca un rol important în procesul aterosclerozei. Cantitatea de LPL sintetizată de macrtofage este influențată de stresul oxidativ. Cercetările au arătat că mutațiile la nivelul genei ce codifică LPL pot afecta activitatea enzimei, determinînd o dezvoltare mai rapidă a leziunilor aterosclerotice.

După acțiunea LPL asupra chilomicronilor, aceștia sunt transformați în particule reziduale numite chilomicroni remanenți, avînd în compoziția lor mai ales apolipoproteinele B - 48 și E. La nivelul ficatului, chilomicronii remanenți sunt captați prin intermediul unor receptori hepatocelulari specifici și componentele lor lipidice sunt catabolizate sub influența enzimelor lizozomale (fig.5.17a).

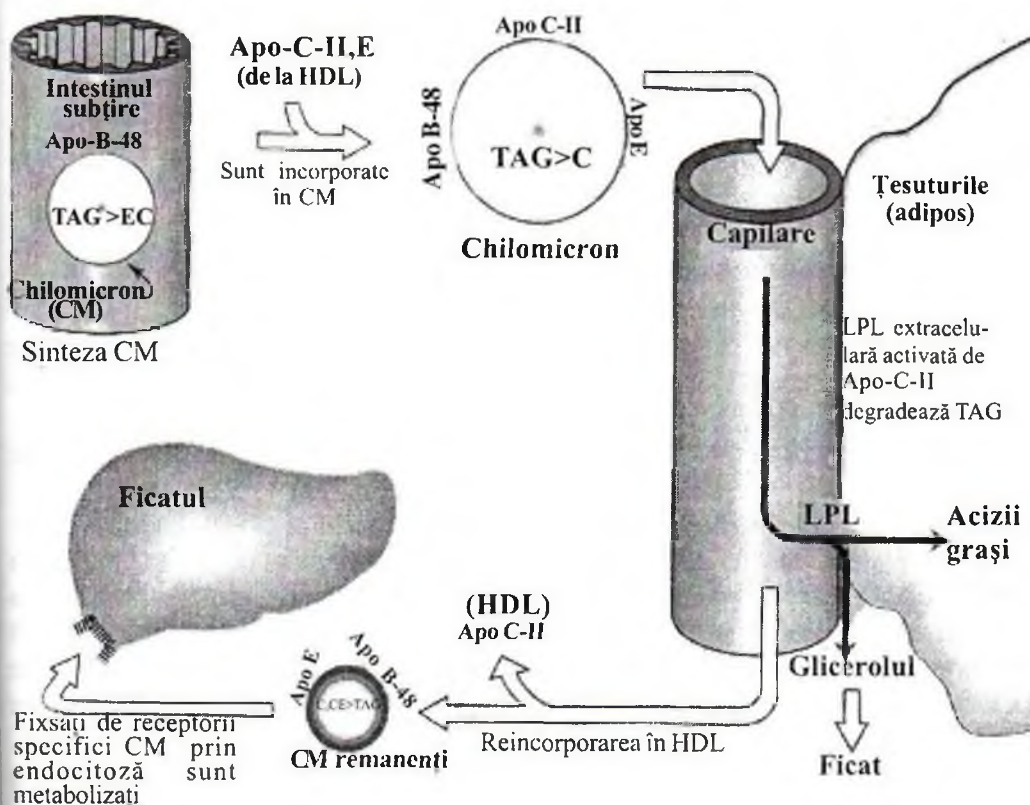


Figura 5.17a. Metabolismul chilomicronilor (CM-chilomicron; TAG-triacilglicerol; C-colesterol; EC - esterii colesterolului; LPL - lipoproteinlipaza)

LIPIDELE SÎNGELUI

Metabolismul chilomicronilor este perturbat de deficiențe în lipoproteinlipază. Ca rezultat, se înregistrează sporiri evidente şi persistente ale TAG, depunerea lor în țesuturi (boala ereditară – *hiperlipoproteinemie de tip I*). Anomalia sintezei apolipoproteinei B la nivel intestinal frînează formarea chilomicronilor şi transportul lipidelor exogene. TAG se acumulează în celulele intestinale şi, consecutiv, se perturbă absorbția altor lipide din intestin – *steatoree*, evidențiindu-se şi o carență de vitamine liposolubile (fig.5.18).

Lipoproteinele sunt sintetizate la nivelul ficatului şi intestinului din lipide endogene şi exogene.

Anabolismul lipoproteinelor cuprinde următoarele etape principale:

- sinteza componentelor lipidice (triacilglicercli, fosfolipide, colesterol liber, colesteride);
- sinteza apolipoproteinelor;
- asamblarea lipoproteinelor sintetizate în torentul circulator.

Lipoproteidele sîngelui sunt legate necovalent, dar durabil. Aceste structuri sunt solubile în apă şi bine adaptate la transportul lipidelor în diferite țesuturi şi organe. Cu cît conținutul lipidic e mai mare, cu atît densitatea lor e mai mică. Chilomicronii au o densitate mai mică de 0,85 g/mL.

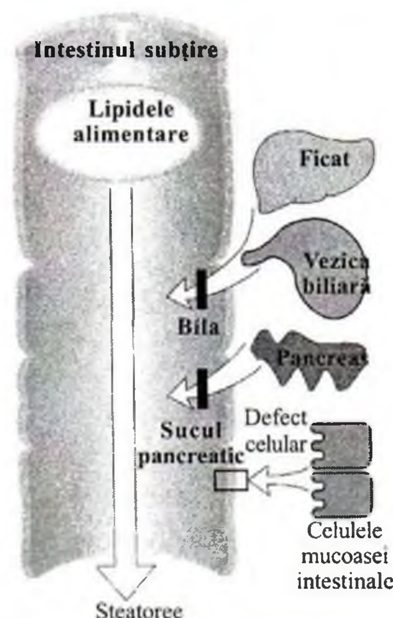


Figura 5.18. ***Cauzele posibile ale steatoreei***

În concordanță cu densitatea lor crescîndă la ultracentrifugare (flotație), lipoproteinele se clasifică în: chilomicroni, lioproteine cu densitate foarte mică (VLDL), lipoproteine cu densitate mică (LPL), lipoproteine cu densitate intermediară (IDL) şi lipoproteine cu densitate mare (HDL).

Principalele caracteristici fizice şi compoziția chimică ale lipoproteinelor sîngelui e redată în tab.5.2.

VLDL (pre-β-lipoproteide) sunt sintetizate în ficat; funcția principală constă în transportul TAG sintetizate în ficat, mai ales după o rație alimentară bogată în glucide: la inaniție, diabet zaharat, grație sintezei lor din acizi grași liberi circulanți. Amplificarea căilor de sinteză a TAG hepatice şi/sau perturbarea căilor de sinteză şi export finalizează cu acumularea grăsimilor în ficat – *infiltrație adipoasă a ficatului*. Agenții cu acțiune protectoare sau care înlesnesc exportul TAG hepatice sunt denumiți *factori lipotropi* (metionina, grasimile nesaturate, vit. E etc.)

Procesul de asamblare a VLDL are loc în reticulul endoplasmatic. Pentru acest proces sunt utilizați în principal TAG din citozol. Acizii grași din plasmă sunt inițial esterificați pe suprafața citozolică a reticulului endoplasmatic în TAG, care intră într-o proporție redusă în VLDL şi trec preponderent în citozol. TAG citozolici sunt hidrolizați de o lipază

Tabelul 5.2. ***Compoziția chimică şi caracteristicile fizice ale lipoproteinelor sîngelui***

Clasa de lipoproteine	*Densitatea (g / mL)*	*Masa Moleculară (Da)*	*Diametru (nm)*	*Mobilitatea electroforetică*
Chilomicronii	< 0,95	$5,0 \cdot 10^9$	$10^2 - 10^3$	Nu migrează
VLDL	0,95 - 1,006	$7,5 \cdot 10^6$	30 - 70	Pre-β
LDL			15 – 25	β
LDL_1 (IDL)	1,006 - 1,019	$2,5 \cdot 10^6$		între β
LDL_2	1,019 - 1,063			şi pre-β
HDL				α
HDL_1	< 1,063			
HDL_2	1,063 - 1,125	$3,9 \cdot 10^5$	6 – 14	
HDL_3	1,125 - 1,210	$1,9 \cdot 10^5$	6 - 10	

Clasa de lipoproteine	*TAG (%)*	*Colesterol liber (%)*	*Colesterol esterificat (%)*	*Fosfolipide (%)*	*Apolipoproteine (%)*
Chilomicronii	86 - 94	0,5 - 1	1,0 - 3	3,0 - 8	1,0 - 2
VLDL	55 - 65	6,0 - 8	12 - 22	12 - 18	5,0 - 10
LDL	8 - 12	5,0 -10	43 - 50	20 - 25	20 - 24
HDL	3 - 6	3,0 - 5	14 - 18	20 - 30	45 - 50

specifică, iar acizii graşi rezultați pătrund în reticulul endoplasmatic, unde sunt esterificați sub formă de TAG care servesc ca precursori în sinteza VLDL. Prin unirea componentelor lipidice cu apolipopreteinele B-100 şi E în reticulul endoplasmatic, rezultă particulele prelipoproteice. Acestea trec în aparatul Golgi, unde are loc formarea veziculelor secretoare din care VLDL sunt eliberate în circulație. În sînge, VLDL primesc apolipoproteinele C de la HDL, între care apolipoproteina C-II, cofactor al LPL. S-a constatat că diminuarea cantității de apolipoproteină C-II este asociată, cu scăderea activității LPL şi acumularea de chilomicroni şi VLDL.

La nivelul țesuturilor extrahepatice, TAG din componența VLDL sunt hidrolizați de LPL în acizi graşi şi glicerol (fig.5.18a).

Endoteliile vasculare ale muşchiului scheletic, inimii, țesutului adipos şi creierului conțin un receptor care recunoaşte VLDL prin intermediul apolipoproteinei E. Acest receptor poate juca un rol important în catabolizarea VLDL de către țesuturile periferice.

În plasmă, VLDL cedează colesterol liber, triacilgliceroli şi fosfolipide particulelor de HDL. Totodată, are loc deplasarea apolipoproteinelor C şi E din VLDL înapoi spre HDL. Ca rezultat al acestui schimb şi al acțiunii LPL, VLDL se transformă în lipoproteine *intermediare (IDL),* conținînd aproape numai apolipoproteine B-100 şi E.

Metabolizarea IDL se poate realiza pe două căi. Una constă în fixarea IDL de receptorii hepatici specifici. Alta – în pătrunderea IDL în spațiile Disse hepatice, unde suportă un atac lipolitic al lipazei hepatice şi pierd apolipoproteina E. În felul acesta, IDL devin LDL.

LDL (β-lipoproteide) se formează în plasmă din cele pre β, sub acțiunea LPL (lipoproteidlipazei) şi înnobilate cu colesterol (din α-LP şi cu participarea enzimei LCAT (lecitin-colesterol-acil-transferază) – enzimă plasmatică ce catalizează reacția:

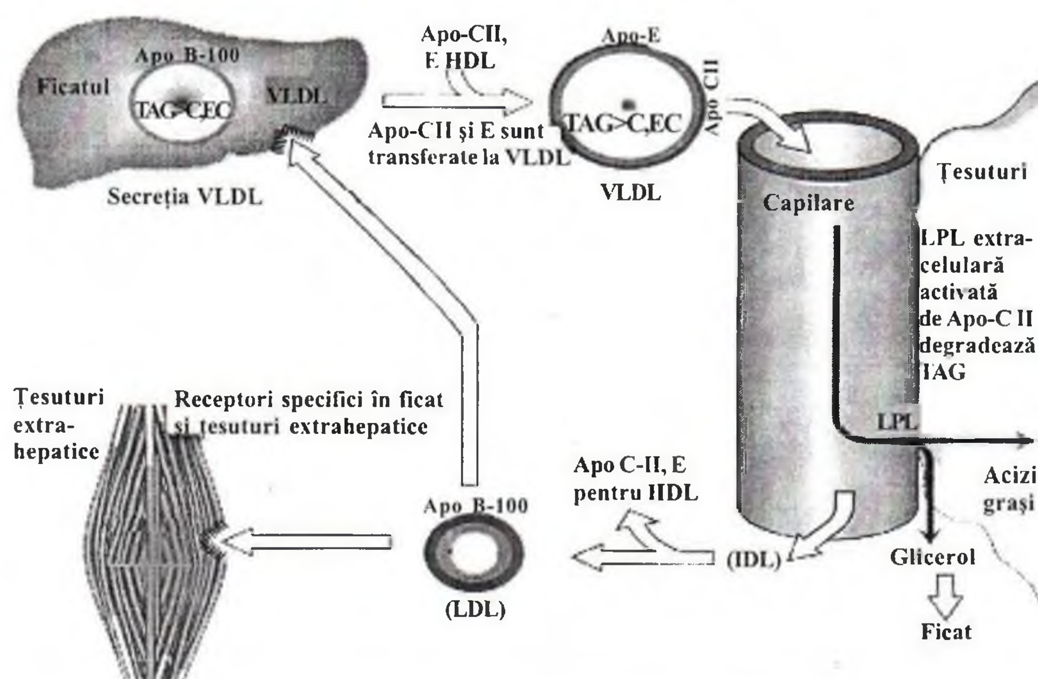


Figura 5.18a. *Metabolizarea VLDL și LDL: TAG— triacilglicerol, C,EC— colesterol și esterii colesterolului; LPL—lipoproteidlipaza*

lecitină + colesterol ⟶ 2-lizolecitină + acilcolesterol). Rolul LDL constă în capacitatea de a furniza colesterol diverselor țesuturi. Concentrația mărită de LDL, ca și a apolipoproteinei B, are semnificația de predicție a factorului de risc la ateroscleroză. Structurarea lor e reprezentată în fig. 5.19.

Particulele de LDL se fixează pe suprafața celulelor prin intermediul unor receptori specifici localizați în caveolele membranei plasmatice. *Receptorul LDL* în membranele plasmatice este o glicoproteină de 115 kDa, cu 839 aminoacizi și 5 domenii. Domeniul 1 (292 resturi de aminoacizi) este situsul de legare a lipoproteinelor care conțin apolipoproteinele B-100 și E. Domeniul 2 (350-400 resturi de aminoacizi) este un segment conținînd oligoglucide N-legate. Domeniul 3 (58 resturi de aminoacizi) este fragmentul care străbate membrana. Domeniul 5, un segment de 50 resturi de aminoacizi, este necesar pentru agregarea receptorilor LDL în timpul endocitozei. Complecșii receptori –LDL – sunt endocitați în celulă sub formă de vezicule care fuzionează cu lizozomii. Particulele de LDL sunt degradate de proteazele și lipazele acide lizozomale.

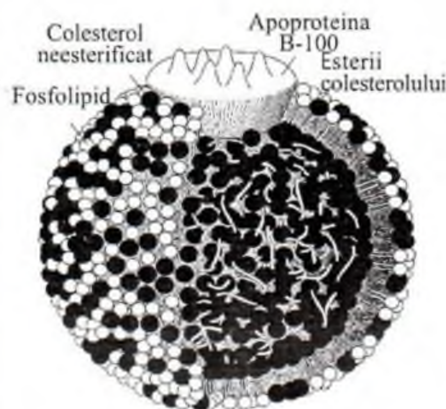


Figura 5.19. *Structura β-lipoproteidelor*

Colesterolul liber rezultat astfel difuzează din lizozomi în citozol, unde poate fi implicat în:
- biosinteza membranelor;
- inhibiția β-hidroxi-β– metilglutaril-CoA reductazei, enzimă limitantă în sinteza colesterolului;
- activarea acil-CoA: colesterol-acil-transferazei care catalizează esterificarea colesterolului intracelular cu acil-CoA; colesterolul reesterificat conține mai ales acid oleic şi acid palmitoleic, care sunt acizi graşi mononesaturați, în timp ce esterii de colesterol în LDL sunt bogați în acid linoleic;
- modularea sintezei receptorilor LDL şi, prin urmare, limitarea captării LDL.

Gena pentru receptorul LDL, asemănătoare cu cea pentru reductază, conține un element reglator sterolic care controlează rata de sinteză a RNAm.

Deci, LDL intervine în transportul colesterolului spre organele periferice şi în reglarea sintezei colesterolului *de novo* în situsurile respective.

Unele LDL nu sunt captate de receptorii pentru apolipoproteinele B/E, deoarece ele au suferit modificări prin peroxidare sau acetilare. Se atestă că oxidarea LDL de către celule în pereții arterelor joacă un rol determinant în patogenia aterosclerozei şi în dezvoltarea simptomelor clinice. Oxidarea LDL este un fenomen complex care începe cu extracția unui atom de hidrogen de la un acid gras polinesaturat din particula de LDL. Radicalii peroxil şi alcoxil formați pot iniția oxidarea acizilor graşi vecini. LDL oxidate sunt catabolizate pe calea receptorilor «scavenger» ai macrofagelor. Aceşti receptori nu sunt inhibați de conținutul intracelular de colesterol şi macrofagele pot absorbi un exces de LDL, încărcîndu-se astfel cu lipide şi transformîndu-se în celule spumoase. Acest mecanism poate constitui una din cauzele de instalare a leziunilor aterosclerotice.

HDL (α-lipoproteide) sunt sintetizate şi secretate de hepatocite, avînd o configurație discoidală. În particulele mature sunt transformate de LCAT. Ele preiau colesterolul din țesuturi şi din alte proteine plasmatice, pentru ca în final să se catabolizeze în ficat. Subiecții, care reprezintă niveluri înalte ale acestor parametri, sunt protejați, posedă factori reduşi de risc ai aterosclerozei şi viceversa – la nivele scăzute de α-LP.

Există patru subclase de HDL: HDL_1, HDL_2, HDL_3 şi lipoproteine cu densitate foarte mare (VHDL). HDL_2 şi HDL_3 sunt cele mai importante şi rezultă în urma principalelor transformări metabolice. Primele HDL secretate în circulația sanguină de hepatocitele numite HDL născînde nu conțin esteri de colesterol şi au un procent scăzut de colesterol. Particulele acestor lipoproteine prezintă o formă discoidală. Treptat, ele se îmbogățesc de colesterol şi fosfolipide. Pe măsura captării colesterolului celular, intervine enzima lecitin: colesterol-acil-transferaza (LCAT) care catalizează reacția dintre colesterol şi fosfatidilcholină, conducînd la colesteride. LCAT este o glicoproteină cu masa moleculară = 59 000Da. Această enzimă este asociată cu HDL în plasma sanguină şi este activată de apolipoproteina A-1 şi inhibată de apolipoproteina A-2 care intră în structura acestor lipoproteine.Cercetările recente au arătat că în organismul persoanelor cu risc înalt de ateroscleroză este prezentă o LCAT care sintetizează esteri de colesterol preferențial cu acizi graşi saturați, spre deosebire de enzima de la persoanele normale, cu specificitate pentru acizii graşi nesaturați. De complexul LCAT -HDL este asociată o proteină ce transferă esterii de colesterol (CETP = cholesteryl ester transfer protein) din

HDL la VLDL sau LDL. CETP reprezintă o glicoproteină hidrofobă care se sintetizează în special în ficat şi ţesutul adipos.

Hipercolesterolemia şi *hipertriacilglilcerolemia* stimulează funcţia CETP, iar hipotiroidismul diminuează acţiunea acestei proteine. De asemenea, la subiecţii cu afecţiuni cardiovasculare şi la cei cu diabet insulino-dependent se observă o creştere a transferului realizat de CETP. Esterii de colesterol formaţi datorită LCAT, fiind mai hidrofobi, părăsesc suprafaţa HDL şi trec în mijlocul particulelor. Ca rezultat, forma lor discoidală devine sferică, astfel apare HDL_3. Ele reprezintă HDL de talie mică şi de densitate mare, fiind capabile de a primi colesterol şi de a-l esterifica cu ajutorul LCAT. Aceste lipoproteine se transformă în HDL de talie mare, HDL_2, cu densitate mai mică, dar mai bogate în triacligliceroli, avînd rolul de a transporta steridele spre ficat sau alte lipopreteine (VLDL şi LDL). Deci, HDL_2 sunt adevăratele lipoproteine antiaterogene, întrucît ele epuizează excesul de colesterol.

La nivelul ficatului, colesterolul liber poate fi eliminat în bilă sau poate servi pentru sinteza acizilor biliari. Lipaza hepatică hidrolizează triacilglicerolii şi fosfolipidele HDL_2, permiţînd conversia reversibilă a acestora în HDL_3 care intră în circulaţie.

Componenţii apoproteinici, de rînd cu rolul structural la menţinerea stabilităţii, posedă şi proprietăţi de activatori ai enzimelor (LCAT) (tab.5.3).

Tabelul 5.3 ***Apolipoproteinele din componenţa lipoproteinelor***

Apolipoproteina (Apo)	*Masa moleculară kDa*	*Concentraţia plasmatică (mg / 100 mL)*	*Locul de sinteză*	*Funcţia*	*Distribuţia (%) din totalul apolipoproteinelor*
Apo A-1	28,3	110 - 200	Ficat, intestin	Activator al LCAT	HDL (67%)
Apo A-2	17,0	30 - 50	Ficat, intestin		HDL (22 %)
Apo A-4	45,0	15	Intestin	Permite efluxul de colesterol	
Apo B-48	240,0	3 - 5	Intestin	Secreţia chilomicronilor	Chilomicroni
Apo B-100	513,0	60 - 140	Intestin	Secreţia VLDL, ligand pentru LDL	VLDL (90%) LDL (35%)
Apo C-I	7,0	4 - 6	Ficat	Activator al LCAT	Chilomicroni, VLDL, HDL
Apo C-II	8,9	3 - 5	Ficat	Activator al LPL	Chilomicroni, VLDL, HDL
Apo C-III	8,7	12 - 14	Ficat	Inhibitor al LPL	Chilomicroni, VLDL, HDL
Apo D	33,0	6 - 7	Rinichi, ficat, placentă, intestin	Metabolismul esterilor de colesterol	HDL
Apo E	34,1	3 - 5	Macrofage, suprarenale, ficat, intestin	Ligand pentru receptorii LDL şi IDL	Chilomicroni, VLDL (15%), IDL, HDL.

Apolipoproteina A-1 este apoproteina majoră a lipoproteinelor «protectoare» de aterom, HDL. Apolipoproteina A-1, ca şi apolipoproteina C-I, activează lecitin - colesterol acil-transferaza (LCAT), deci joacă un important rol în conversia colesterolului în colesteril esteri, care sunt transferați din HDL spre alte lipoproteine. Acest transport se face cu ajutorul proteinei de transfer a colesteril esterilor.

Apolipoproteina B-100 intră în constituția lipoproteinelor aterogene, LDL şi VLDL. Ea este implicată în transportul triacilglicerolilor şi VLDL din ficat care are o importanță vitală în calitate de ligand, prin intermediul căruia receptorii celulari recunosc, captează şi internalizează LDL şi IDL pentru catabolizare.

Apolipoproteina B-100 este o proteină mare, de circa 549 000 Da, alcătuită din domenii hidrofile şi hidrofobe. Ea înveleşte suprafața particulei lipoproteice. În organismul uman apo B-100 se sintetizează în ficat. În schimb, apo B-48 este sintetizată exclusiv în mucoasa intestinală şi se găseşte în chilomicroni. Sunt lipoproteine care transportă lipidele din intestin în ficat. Ambele apolipoproteine – B-100 şi B-48 – sunt sintetizate pe o singură genă.

Asemănător sintezei altor proteine secretoare, translația apolipoproteinelor B se descoperă în ribozomii ataşați la reticulul endoplasmatic. Din cauza domeniilor proteinice hidrofobe ale apo B, ultima rămîne ataşată la membrana reticulului endoplasmatic pînă cînd se vor lega suficiente lipide penru a se forma o particulă mică de lipoproteină născîndă. O proteină, numită *proteină microzomală de transfer al triacilglicerolilor* (microsomal triacilglicerol transfer protein = MTP), favorizează transferul colesteril esterilor, fosfolipidelor şi triacilglicerolilor din reticulul endoplasmatic la apo B, conferindu-i acesteia din urmă capacitatea de a se detaşa de membrana reticulului endoplasmatic. Această fază este unul din situsurile majore ale reglării sintezei şi secreției apo B. RNAm al apo B este exprimat constitutiv şi producția de apo B este reglată în schimb prin abilitatea apo B de a lega lipide şi a forma o particulă lipoproteică care este gata pentru secreție. Dacă nu există suficiente lipide disponibile şi apo B nu poate forma o particulă lipoproteică, atunci apo B este supusă degradării intracelulare sub acțiunea proteazelor. În această situație disponibilul de lipide alimentare sau sintetizate endogen controlează viteza producției de apo B. Particula lipoproteică născîndă o dată formată se măreşte prin fuziune cu picăturile de lipide care iau naştere în reticulul endoplasmatic neted, unde se descoperă biosinteza majorității lipidelor. Particula lipoproteică mărită este apoi transportată la aparatul Golgi unde sunt adăugate lipidele adiționale. Apo B este în final modificată prin glicozilare, după care particula lipoproteică maturizată este secretată în sistemul limfatic.

Inițial, se consideră că abetalipoproteinemia este cauzată de o mutație a genei pentru apo B, avînd ca rezultat scăderea vitezei de transcriere. Insă, unele studii au detectat cantități crescute de RNAm pentru apo B în celulele pacienților cu abetalipoproteinemie. Cercetările ulterioare au arătat că gena defectată nu este legată cu apo B. De asemenea, s-a constatat că proteina apo B este sintetizată în abetalipoproteinemie, dar nu este secretată din celulă, ceea ce sugerează un defect în asamblarea lipoproteinei. Recent s-a stabilit că activitatea MTP este insuficientă la subiecții cu abetalipoproteinemie. De aici s-a dedus că MTP este defectul primar rezultat în urma mutației punctiforme a genei.

În absența MTP, apo B nu se poate agrega cu lipide și ca urmare nu poate fi eliberată din membrana reticulului endoplasmatic. Calea degradativă intracelulară normală care controlează secreția post-transcripțională a apo B se pare a fi responsabilă de apo B descompusă. În cazul acestui defect, apo B nu se sintetizează în intestin și ficat, ceea ce împiedică secreția chilomicronilor, VLDL și LDL. Lipsa acestor lipoproteine din sînge justifică hipercolesterolemia în abetalipoproteinemie.

De notat că în dezvoltarea afecțiunilor aterosclerotice, apolipoproteina B-100 se acumulează la nivelul acestora cu o viteză mai mare, decît colesterolul. Se consideră că nivelul plasmatic ridicat al apo B-100 constituie un factor de risc pentru ateroscleroză, mai important decît creșterea colesterolului sau a triacilglicerolilor. Sinteza hepatică a apo B-100 se intensifică la alimentația înbogățită de zaharoză, cît și de lipide saturate și colesterol.

Apolipoproteina C-II activează lipoproteinlipaza care hidrolizează TAG din VLDL și chilomicroni.

Apolipoproteina C-III poate inhiba legarea unor lipoproteine la receptorii hepatici.

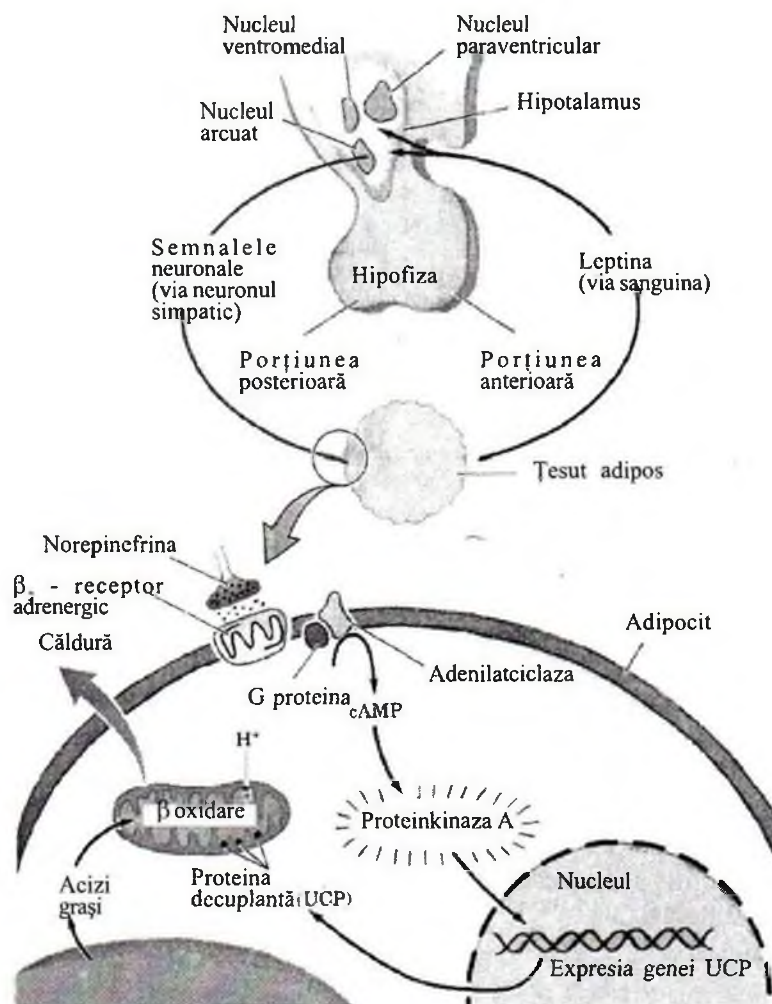
Apolipoproteina E este un important determinant al afinității lipoproteinelor, conținînd apoproteina E, incluzînd IDL și chilomicronii remanenți pentru receptorii lor hepatici.

Lipidele organismului uman. Ele sunt sursa principală endogenă a acizilor grași, ce determină energia. Aceste lipide se depozitează în țesutul adipos. Lipogeneza constă în sinteza trigliceridelor de depozit, la nivelul adipocitelor. Substraturile biosintezei trigliceridelor sunt acizii grași și glicerolul. Acizii grași liberi provin din degradarea triglicerolilor transportați de VLDL și chilomicroni. Acizii grași sunt activați prin transformarea lor în acil-CoA, sub acțiunea acil-CoA-sintetazei. Adipocitele pot utiliza doar glicerolul endogen rezultat din catabolismul glucozei. Glucoza pătrunde în adipocite prin intermediul transportatorului său GluT 4 și este oxidată prin reacțiile glicolizei, formînd dihidroxiacetonfosfat. Forma activă a glicerolului rezultă din reducerea acestui intermediar la glicerol-3-fosfat, cauzată de dihidroxiacetonfosfat dehidrogenaza, în prezența coenzimei NADH + H^+.

Leptina este o proteină reglatoare sintetizată la nivelul țesutului adipos, e compusă din 167 resturi de aminoacizi. Unul din efectele sale metabolice este suprimarea aportului alimentar, prin interacțiunea cu receptorul său hipotalamic specific, stimulînd sinteza neuropeptidelor (POMC, CRH, CART – apetit supresoare). La interacțiunea leptinei cu eliberarea neuropeptidei Y se stabilește un răspuns contrar: cu activarea sistemului parasimpatic, micșorarea temperaturii și a fertilității.

Leptina alterează transmisia sinaptică în neuronii nucleului arcuat, stimulînd hiperpolarizarea neuronilor simpatici hipotalamici, cu eliberarea norepinefrinei în sinapsele adipocitelor. Prin intermediul β_3 - adrenoreceptorilor și eliberarea AMPc are loc activarea proteinkinazei A, care facilitează transcrierea genei UCP. Proteina decuplantă mitocondrială (UCP-1) sintetizată determină efectul termogen drept consecință a modificărilor funcției complexului ATP-sintazic (vezi schema de mai jos).

Reglarea lipogenezei adipocitare are loc sub controlul factorilor endocrini, dintre care cel mai important este insulina. Creșterea secreției de insulină în perioadele post



Reglarea hipotalamică a stocării şi mobilizării de energie

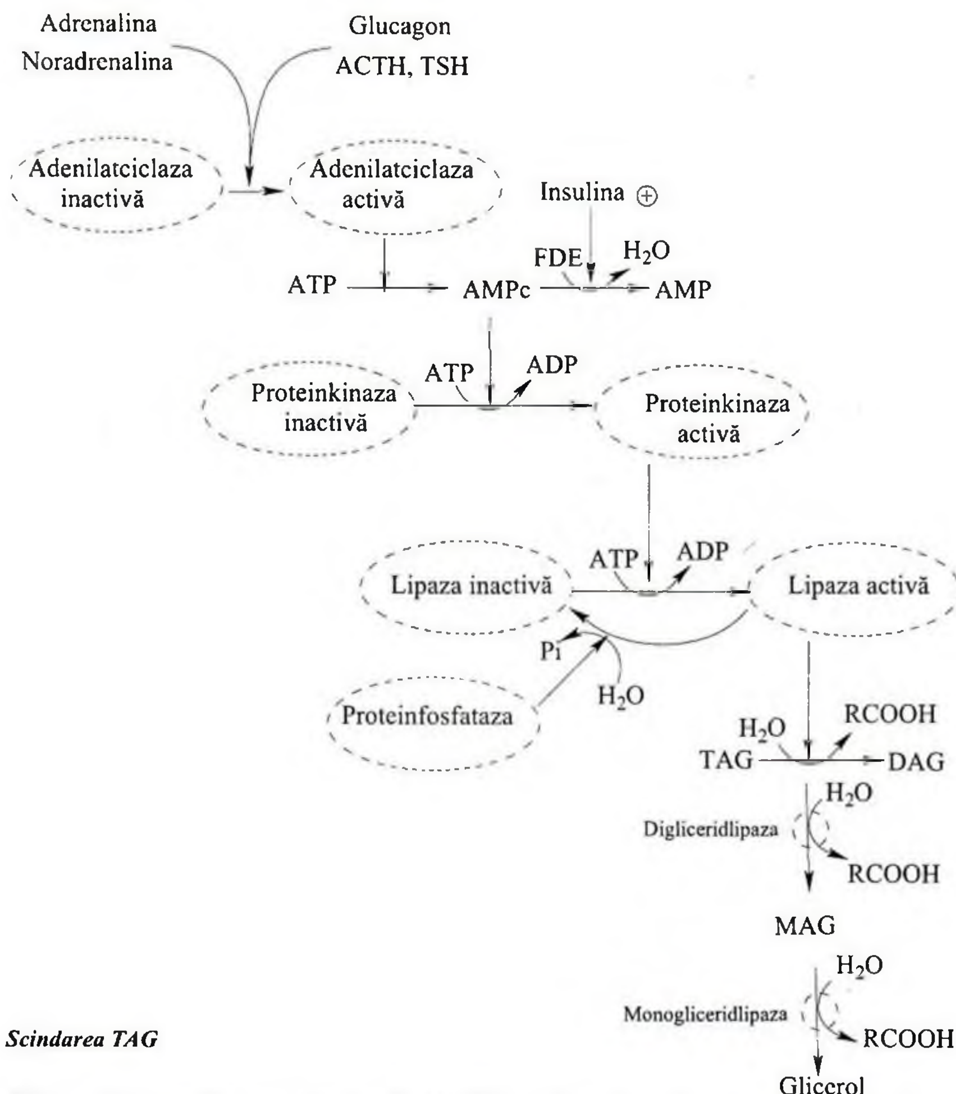
-prandiale activează lipogeneza la nivelul ţesutului adipos prin următoarele mecanisme:

a) inducerea transcrierii genei pentru LPL;

b) activarea transportatorilor GluT 4 la nivelul adipocitelor;

c) amplificarea glicolizei prin activarea fosfofructokinazei I (prin creşterea concentraţiei de fructozo-2,6-difosfat).

În perioadele interalimentare aceste efecte sunt suspendate prin scăderea secreţiei de insulină. Acest fapt duce la activarea procesului invers, lipoliza. Lipoliza constă în degradarea trigliceridelor de depozit, la nivelul adipocitelor. Drept sursă de energie pot servi numai acizii graşi liberi, neesterificaţi. TAG sunt scindate de enzimele tisulare specifice – lipaze – pînă la glicerol şi acizi graşi. Ultimii se fixează de albumine în plasmă, apoi sunt transportaţi la destinaţie şi utilizaţi după scindarea legăturii cu proteinele. Celulele glicodependente (în principal, eritrocitele) şi creierul nu pot utiliza acizii graşi ca sursă de energie.



Scindarea TAG

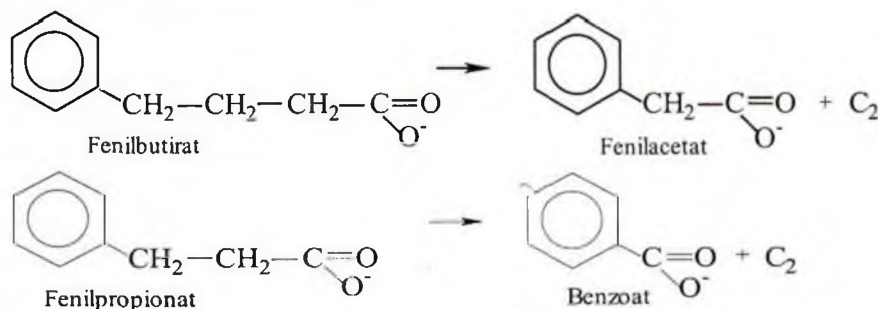
Glicerolul rezultat nu poate fi reutilizat în eritrocite, deoarece acestea nu dispun de *glicerol kinază*. Ca urmare, glicerolul este eliberat în circulație și captat de ficat, care-l utilizează pentru sinteza de glucoză, prin gluconeogeneză.

În lipoliză, o însemnătate cardinală o are *trigliceridlipaza* – enzimă hormonodependentă; activitatea di- și mono- gliceridlipazelor este de 10-100 de ori mai intensă decît a TG-lipazei.

Aceasta din urmă e activată de *adrenalină, noradrenalină, glucagon*, deci reprezintă o enzimă reglatoare. Hormonul primar interacționează cu receptorii celulari, modificînd structura lor, ca rezultat e activată *adenilatciclaza* ce favorizează sinteza AMPc din ATP. AMPc activează o *proteinkinază* care, fosforilînd TG-lipaza, o activează. Produsele, glicerolul și acizii grași sunt scindați sau utilizați la sinteză. Acizii grași pot fi obținuți și din fosfolipidele membranare ca rezultant al reînnoirii lor metabolice permanente, cu formarea acizilor grași liberi (vezi schema de mai sus).

DEGRADAREA OXIDATIVĂ A ACIZILOR GRAŞI (SPIRALA LUI LYNEN)

La studierea mecanismului de oxidare a acizilor graşi un merit aparte îl are savantul Franz Knoop. În 1904, alimentînd cîinii cu acizi graşi cu număr par de atomi C, în molecula cărora un atom H din grupa CH_3 era substituit cu radicalul fenil $-C_6H_5$, a depistat în urina animalelor derivatul acidului fenilacetic; la alimentarea cu acizi graşi cu număr impar de C - derivatul acidului benzoic.

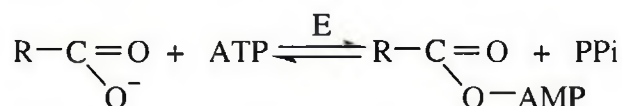


În urma analizei respective, savantul a ajuns la concluzia că acizii graşi se scindează la oxidare la atomul β. În aceste investigaţii pentru prima dată s-a utilizat un compus sintetic marcat pentru descifrarea mecanismelor biochimice.

În anul 1949, E. Kennedy şi A. Lehninger au determinat că oxidarea acizilor graşi se produce în mitocondrii. Mai tîrziu, s-a demonstrat că transferul acizilor graşi în matricea mitocondrială e anticipat de activarea lor: acizii graşi liberi din citozol nu pot penetra membrana mitocondrială.

Activarea acizilor graşi. Acizii graşi conlucrează la toate procesele metabolice numai în stare activă. Paul Berg a demonstrat că procesul include 2 etape:

1. Se formează aciladenilat, anhidridă mixtă, grupa carboxilică a acizilor graşi fiind ataşată de fosfatul AMP, cu eliminarea pirofosfatului:

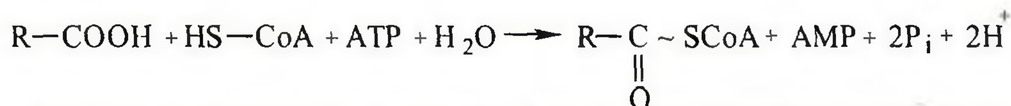


2. Grupa SH a CoA atacă aciladenilatul fixat de enzimă, finalizînd cu formarea acilCoA şi AMP.



Ambele reacţii sunt uşor reversibile. Pirofosfatul se hidrolizează rapid sub acţiunea pirofosfatazei. Reacţia finală devine ireversibilă – sunt utilizate două legături macroergice, dar se formează una singură.

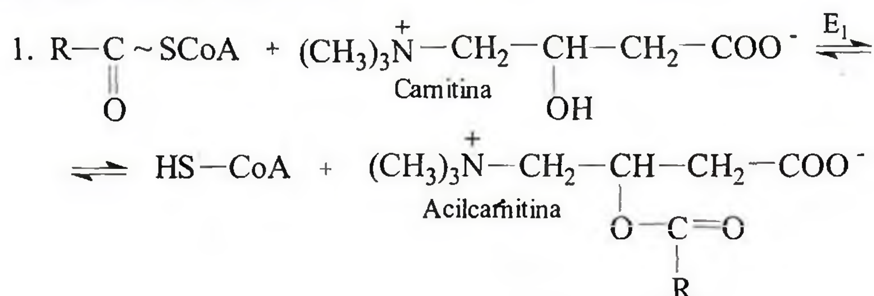
Reacția sumară:

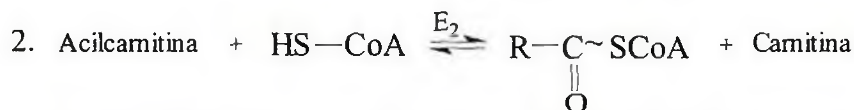


Reacția de activare are loc la suprafața externă a membranei mitocondriale și a reticulului endoplasmatic. Enzima e denumită tiokinaza acizilor grași sau acil CoA - sintetază. Distingem enzimele acetil-CoA sintetaza (C_2-C_3), octanoil-CoA sintetaza (C_4-C_{12}) și dodecanoil-CoA sintetaza (C_{10}-C_{18}). În rol de activatori enzimatici apar ionii K^+ și Mg^{2+}, ca inhibitori – Na^+ și Li^+.

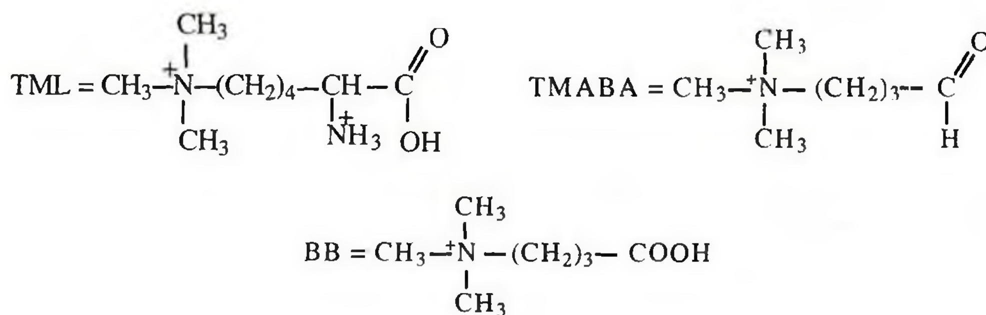
Transportul acizilor grași în mitocondrii. Carnitina (Viamina Bt). Fiind o moleculă cu o catenă lungă, acil-CoA nu poate penetra liber membrana internă mitocondrială. E necesar un mecanism-navetă, cu participarea *carnitinei* (β-hidroxi-γ-trimetilaminobutirat), formată în organismul omului și al mamiferelor (ficat, rinichi) din lizina și metionina activă, cu participarea vitaminei C, B_6, NAD^+. Carnitina este un compus azotat neproteic, provenit și din alimentație.

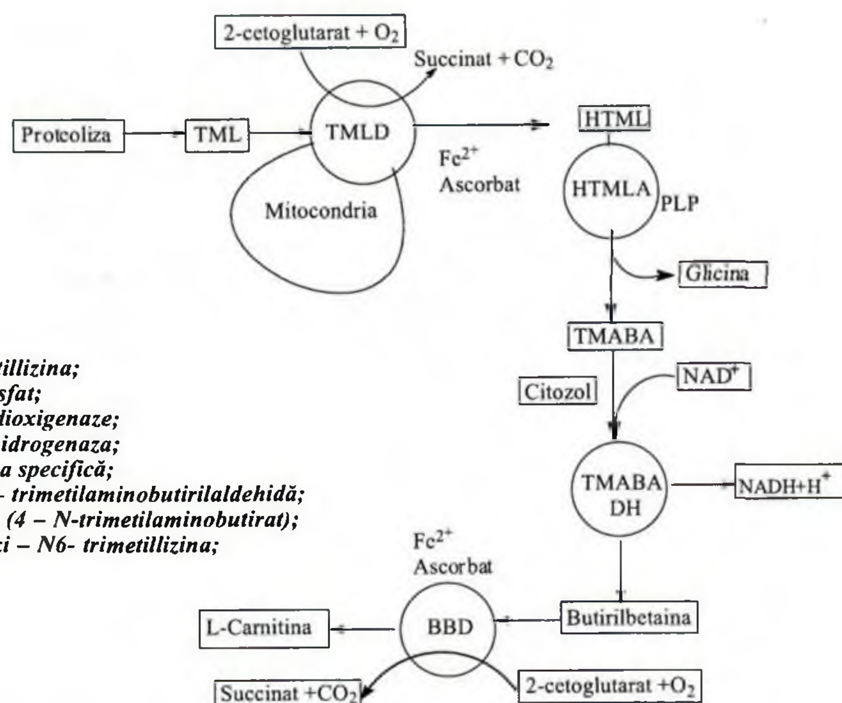
Enzimele (*carnitin – acetil-transferaze*) sunt localizate pe ambele părți ale membranei mitocondriale, cuplate cu o proteină transportatoare (translocaza), care deplasează acilcarnitina în matrice și carnitina în sens opus. Mecanismul transportului acizilor grași constă în următoarele:





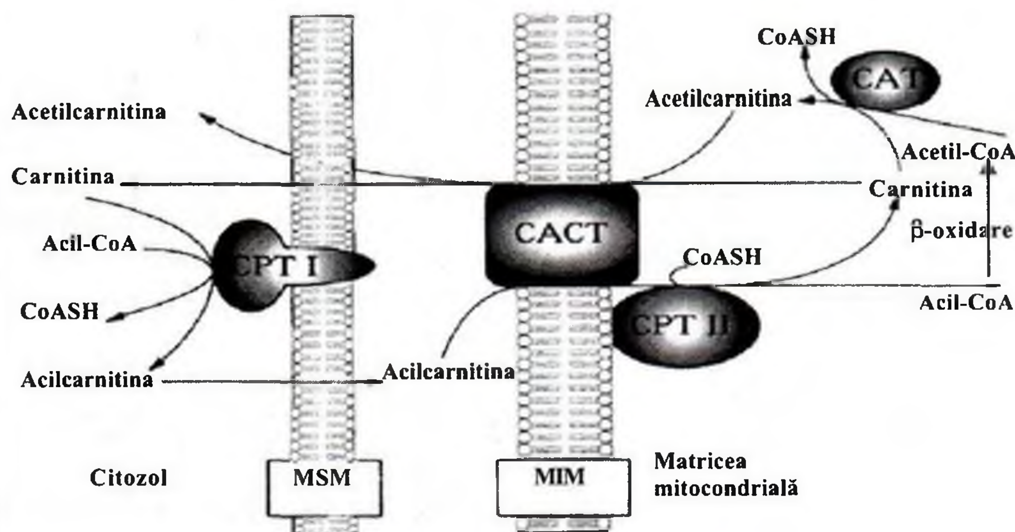
Sinteza carnitinei are loc în modul urmator. Sunt implicați în proces cofactori respectivi și are loc în anumite compartmente celulare:





Notă:
TML = N6- trimetillizina;
PLP = piridoxalfosfat;
TMLD și BBD = dioxigenaze;
TMABADH = dehidrogenaza;
HTMLA = aldolaza specifică;
TMABA = 4 – N – trimetilaminobutirilaldehidă;
BB-Butirilbetaina (4 – N-trimetilaminobutirat);
HTML = 3-hidroxi – N6- trimetillizina;

Schema transferului acizilor grași cu catena lungă în mitocondrii și reglarea ratei mitocondriale de acetil – CoA/ CoA e redată în continuare:

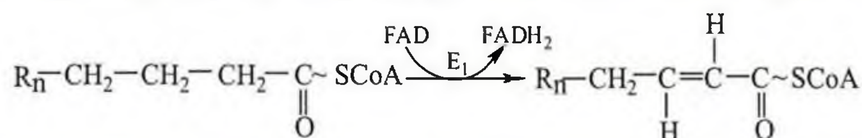


***Notă**: MSM – membrana externă mitocondrială; MIM – membrana internă mitocondrială; CPT I – carnitinpalmitoil transferaza I și CPT II – carnitinpalmitoil transferaza II; CACT – carnitin-acilcarnitin translocaza; CAT – carnitin acetil transferaza*

HSCoA esterii acizilor graşi transferaţi în mitocondrii sunt gata pentru oxidare. Procesul descris permite diferenţierea a două cantităţi de CoA – cea citozolică şi cea mitocondrială, ce îndeplinesc funcţii diferite, examinate anterior (vezi studiul mitocondriilor – oxidarea piruvatului, acizilor graşi, aminoacizilor); CoA-citozolică participînd la procesele biosintetice. Clinic, a fost stabilit că dereglările transferării metabolitului dintr-un compartiment în altul poate cauza maladii la unii gemeni, care din fragedă copilărie suferă de convulsii dureroase în muşchii scheletali. Cercetările efectuate au confirmat că lor le lipseşte *carnitina* – transportatorul acizilor graşi cu catenă lungă. Cantitaţi majore de carnitină în condiţii fiziologice se găsesc în inimă şi muschii scheletali.

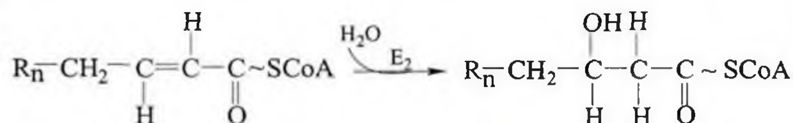
Oxidarea acizilor graşi în mitocondrii. Oxidarea se produce pe etape:

a) Acil-CoA saturaţi în mitocondrii sunt supuşi procesului de dehidrogenare fermentativă la atomii α şi β de C (poziţia 2 şi 3) şi, în rezultat, se formează legături duble.

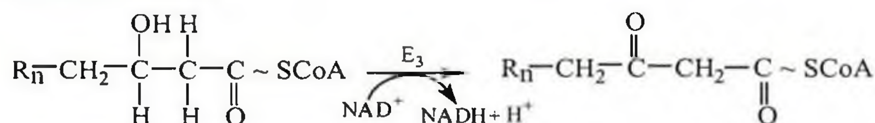


Produsul reacţiei catalizate de acil-CoA-*dehidrogenază* (E_1) e trans-Δ^2-enoil-CoA. Grupa prostetică a E_1 e FAD. $FADH_2$ a enzimei îşi va transmite perechea de e^- unui transportator specific, unui flavoproteid care, la rîndul său, o va transmite ubichinonei din compusul integral al lanţului respirator mitocondrial, formînd două molecule ATP prin fosforilarea a două molecule ADP.

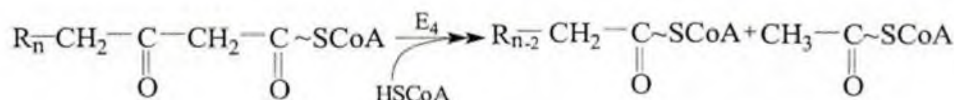
b) La etapa a doua a ciclului de β-oxidare a acizilor graşi are loc hidratarea legăturii duble a trans-Δ^2-enoil-CoA, cu formarea a L-stereoizomerului-β-hidroxiacil-CoA. Reacţia e catalizată de *enoil-CoA hidratază*, căpătată în formă cristalică (este un hexamer).



c) La etapa a treia L-3-hidroxiacil-CoA se dehidrogenează fermentativ cu formarea 3-cetoacil-CoA. Reacţia e catalizată de *L-3-hidroxiacil-CoA DH* cu acceptorul său specific de electroni - NAD^+. Enzima posedă specificitate absolută faţă de L-stereoizomer. Echivalenţii reduşi sunt transmişi în lanţul respirator, cu formarea respectivă a 3 molecule de ATP.



d) Ultima reacţie de oxidare din acest ciclu e catalizată de *acil-CoA acetil transferază (tiolază)*.

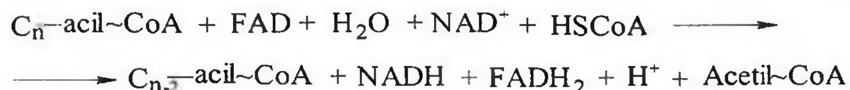


Reacționînd cu HS-CoA liber, substratul se scindează, formînd un fragment de 2 atomi de C (acetil CoA) şi ester al acidului gras cu 2 atomi de C mai puțin. O reacție de *tioliză,* scindare favorizată de interacțiunea cu grupa tiolică din CoA.

Acil-CoA scurtat e supus oxidării continue în acelaşi ciclu, cu formarea în final a unui nou acetil-CoA, reducînd lanțul cu 2 atomi de C.

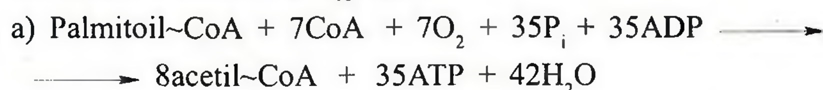
Stoichiometria unui ciclu de β–oxidare:

Oxidarea acidului palmitic, C_{16}~SCoA (palmitoilul-CoA), necesită 7 cicluri. În ultimul ciclu, C_4-oxoacil-CoA, prin tioliză, formează 2 molecule de acetil-CoA.

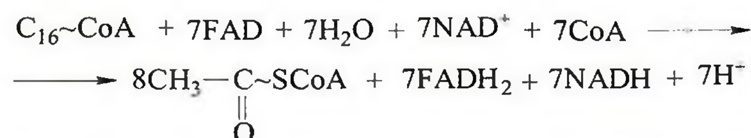


$$C_n\text{–acil}\sim CoA + FAD + H_2O + NAD^+ + HSCoA \longrightarrow C_{n-2}\text{–acil}\sim CoA + NADH + FADH_2 + H^+ + \text{Acetil}\sim CoA$$

Stoichiometria oxidării C_{16}~CoA:

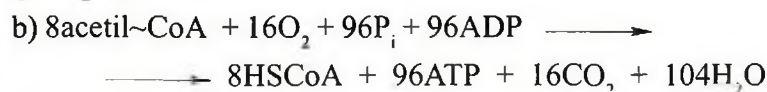


$$\text{a) Palmitoil}\sim CoA + 7CoA + 7O_2 + 35P_i + 35ADP \longrightarrow 8\text{acetil}\sim CoA + 35ATP + 42H_2O$$



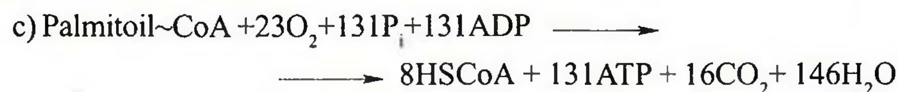
$$C_{16}\sim CoA + 7FAD + 7H_2O + 7NAD^+ + 7CoA \longrightarrow 8CH_3\text{—}\underset{\underset{O}{\|}}{C}\sim SCoA + 7FADH_2 + 7NADH + 7H^+$$

Acetil-CoA, format la oxidarea acizilor graşi, nu se deosebeşte cu nimic de acetil-CoA care se formează din piruvat. Grupa acetilică se oxidează în final pînă la CO_2 şi H_2O, prin ciclul Krebs.



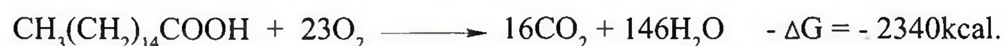
$$\text{b) } 8\text{acetil}\sim CoA + 16O_2 + 96P_i + 96ADP \longrightarrow 8HSCoA + 96ATP + 16CO_2 + 104H_2O$$

Numărul de molecule ATP eliberate în final la oxidarea palmitoil-CoA este: 14 – din $7FADH_2$; 21 – din 7 NADH; 8 x 12 = 96 – din 8 molecule de acetil-CoA, şi în total: 96 + 21 + 14 = 131. Aici trebuie să avem în vedere că 2 legături fosfat macroergice au fost consumate pentru activarea palmitatului la scindarea ATP în AMP şi $2P_i$. Aşadar, beneficiul net în ATP este de 129 molecule la oxidarea acidului palmitic. Suma reacțiilor *a* şi *b* este, respectiv:



$$\text{c) Palmitoil}\sim CoA + 23O_2 + 131P_i + 131ADP \longrightarrow 8HSCoA + 131ATP + 16CO_2 + 146H_2O$$

Arderea acidului palmitic dă un efect energetic major egalat cu:



$$CH_3(CH_2)_{14}COOH + 23O_2 \longrightarrow 16CO_2 + 146H_2O \quad -\Delta G = -2340\text{kcal.}$$

Coeficientul respirator pentru palmitat este de :

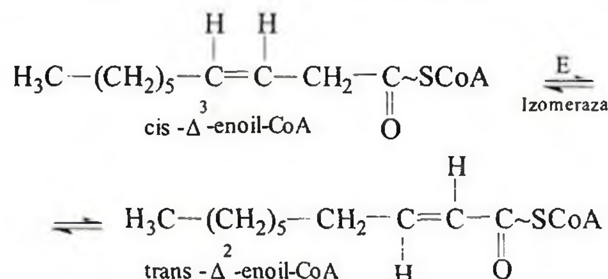
CR = 16mol. CO_2 rezult / 23 mol. O_2 consumat = 0,7

Comparativ cu arderea glucozei:

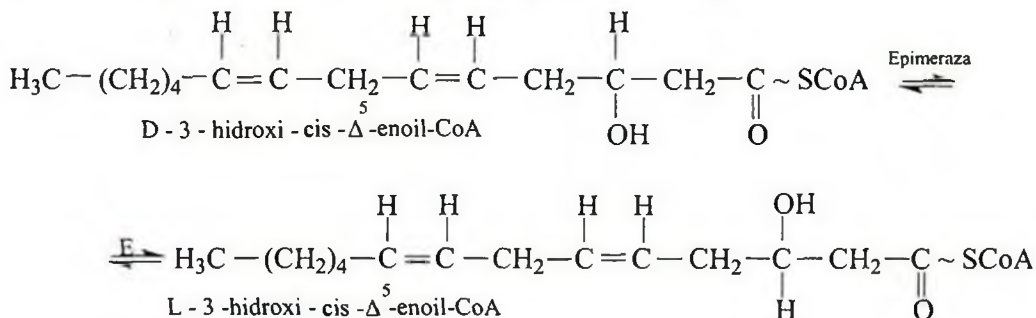
CR = 6mol. CO_2 / 6mol.O_2 = 1,0

Randamentul de conservare a energiei libere în ATP este aproximativ egal cu 40%.

β-oxidarea acizilor grași nesaturați decurge normal pînă în vecinătatea legăturii duble originale, avînd configurația cis. Sunt necesare trei cicluri de scindare. Prezența legăturii duble între C_3 și C_4 împiedică formarea legăturii similare între C_2 și C_3. Sub acțiunea *izomerazei*, legătura dublă trece în trans- Δ^2-legătură dublă:



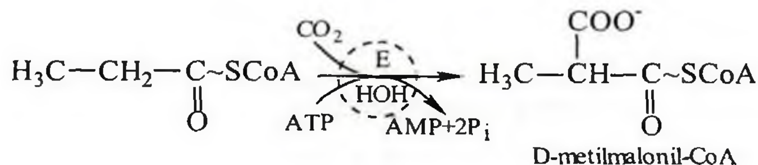
Reacțiile ulterioare se aseamănă cu cele ale oxidării acizilor grași saturați. Pentru oxidarea acizilor grași polienici e necesară și o altă enzimă rezultată din hidratarea legăturii duble D-izomer-3-hidroxiacil-CoA, care nu poate fi substrat al enzimei de tipul L-DH. Enzimă – *epimeraza* modifică configurația grupei OH la C_3.



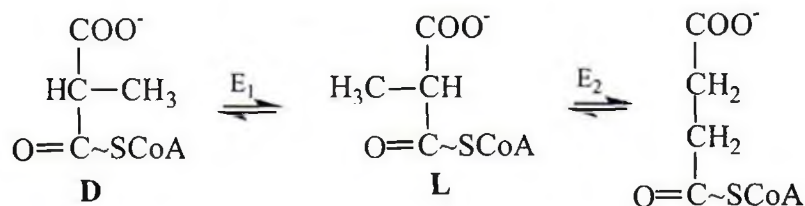
Oxidarea acizilor grași cu număr impar de atomi C

În celulă acizi de acest fel se conțin în cantități mici. Se oxidează în același mod, însă la ultima etapă de scindare se formează o moleculă de propionil-CoA și doar o moleculă de acetil-CoA.

Propionatul în surplus de ATP se carboxilează, cu formarea D-izomerului metilmalonil-CoA. Reacția e catalizată de *propionil-CoA-carboxilaza*, enzimă ce conține vitamina H (biotin dependentă).



Grație unei *racemaze* E_1, D-izomerul este modificat în L, ultimul servind drept substrat pentru o *mutază* E_2, ce îl transformă în succinil-CoA.



Reacțiile descrise au modificatori intramoleculari – grupa C = O, ce migrează de la C_2 la C_3, substituind atomul de H. Izomerizarea neordinară e catalizată de metilmalonil mutază – o enzimă ce conține drept cofactor un compus al vitaminei B_{12}.

Metilmalonil-CoA servește drept produs intermediar și la procesul oxidării unor aminoacizi: metionină, valină, izoleucină. La om s-au înregistrat un șir de tulburări ale metabolismului acestui produs, manifestat încă în fragedă copilărie. Diminuarea sau lipsa completă a enzimei date este un defect genetic, adică netransformarea în succinil-CoA. În sînge și în urină apare acidul metilmalonic, micșorînd pH sîngelui, ce provoacă *acidemie metilmalonică*. Situația poate fi ameliorată numai dacă copiilor li se administrează cantități mari de vitamină B_{12}, la o diminuare a vitezei acestei reacții. Dacă defectul genetic afectează molecula proteică a mutazei, vitamina B_{12} nu e în stare să redreseze situația și maladia devine incurabilă.

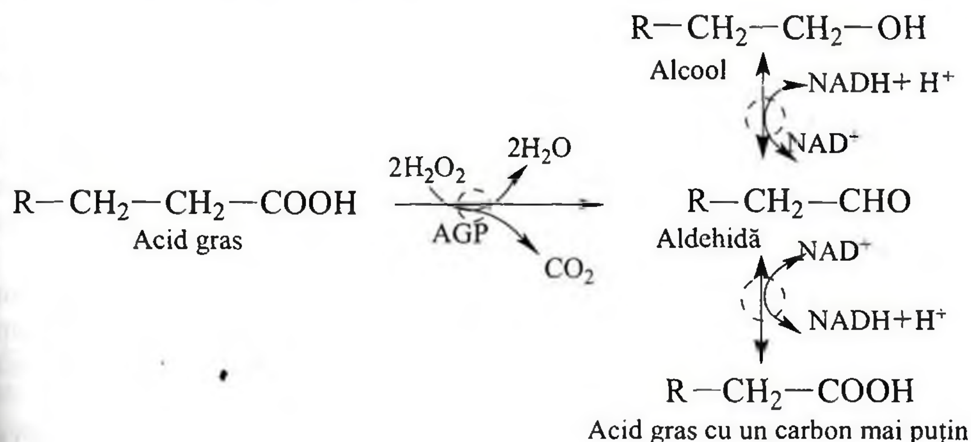
α- și ω-oxidarea. Există *căi alternative* de oxidare a acizilor grași, și anume: *α- și ω-oxidarea.* Numai o mică parte din acizii grași pot fi oxidați prin astfel de mecanisme.

α-oxidarea predomină în țesutul nervos și necesită NAD^+, vit.C, ATP, O_2, Fe^{2+}. Prin acest proces se formează hidroxiacizii grași superiori, proprii lipidelor SNC.

Este o cale particulară de degradare a acizilor grași, fără semnificație cantitativă. Au loc concomitent două procese:

- eliminarea carboxilului sub formă de CO_2 și
- oxidarea C_α la aldehidă.

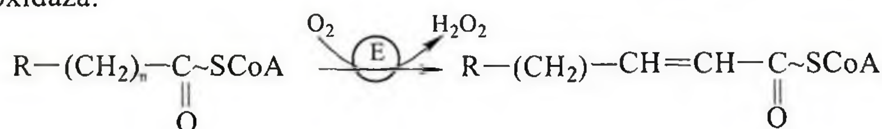
Procesul de α-oxidare are loc în prezența enzimei *acid gras peroxidază (AGP),* care necesită prezența apei oxigenate.



În concluzie, cîteva precizări legate de procesul α-oxidare:
- nu intervine coenzima A;
- nu se formează ATP;
- H_2O_2 necesară rezultă prin autooxidarea flavinenzimelor;
- aldehida rezultată poate fi redusă la alcool sau oxidată la acidul corespunzător, care reia şirul de reacţii;
- reacţiile nu pot duce la degradarea totală a acizilor graşi, deoarece enzima este activă numai la acizii graşi C_{13}-C_{18}.
- α-oxidarea acizilor graşi a fost evidenţiată în creier.

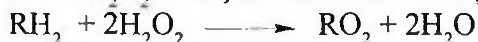
ω-oxidarea catalizată de monooxigenaze hepatice, ce are loc în microzom, necesită O_2, NADPH, cit P-450. În final, acidul gras este degradat prin β-oxidare.

Oxidarea acizilor graşi (C_{20} – C_{26}) în peroxizomi. Oxidarea în cauză conduce la acetil-CoA, dar nu este asociată cu sinteza de ATP. Acetil-CoA difuzează din peroxizomi în mitocondrii, unde este oxidat la CO_2 şi H_2O, cu sinteza cuplată de ATP sau este convertit în corpi cetonici. β - oxidarea peroxizomală diferă de cea mitocondrială prin reacţia de oxidare a acil-CoA la enoil-CoA şi e catalizată de o oxidază:



Catalaza în continuare scindeaza H_2O_2: $2H_2O_2 \longrightarrow 2H_2O + O_2$

Fie că H_2O_2 serveşte ca oxidant în reacţiile catalizate de *peroxidaze*:


$RH_2 + 2H_2O_2 \longrightarrow RO_2 + 2H_2O$

Amploarea β-oxidării în peroxizomi variază în dependenţă de factorii nutriţionali, hormonali, medicamentoşi. Numărul peroxizomilor şi conţinutul lor creşte la diabet, inaniţie, la administrarea unor medicamente (aspirină, agenţi hipolipemianţi), la indigestia în urma reacţiilor cu exces de lipide, la ingerarea acizilor graşi superiori.

Absenţa peroxizomilor cauzează *sindromul Zellweger* manifestat prin creşterea marcată a acizilor graşi cu catenă foarte lungă (C_{24}-C_{26}) şi deces în primele luni de viaţă. La blocarea β-oxidării sau a deficitului de carnitină cota acestor căi este majoră – în urină se depistează derivaţi ai α-hidroxilaţilor şi ai acizilor dicarboxilici, precum şi esteri ai glicerolului şi carnitinei cu radicalii acil.

Deficitul acil CoA dehidrogenazelor (afecţiuni cu transmitere autosomal recesivă) se manifestă după vîrsta de 1 an, o dată cu apariţia unor perioade mai îndelungate între mese –12 ore, cu comă, hipoglicemie severă. În absenţa diagnosticului şi a tratamentului corect imposibilitatea producerii de energie conduce la deces.

Anomaliile enzimelor de transport sau de oxidarea acizilor graşi, cît şi deficitul riboflavinei se evidenţiază în special în organele cu necesităţi metabolice majore (miocardul, muşchiul sceletic). *Steatoza hepatică* se asociază cu insuficienţe pluriorganice şi neuropatii severe.

În plasmă se evidenţiază prezenţa unei hipoglicemii, absenţa corpilor cetonici şi acumularea acidului lactic – *acidoza lactică.*

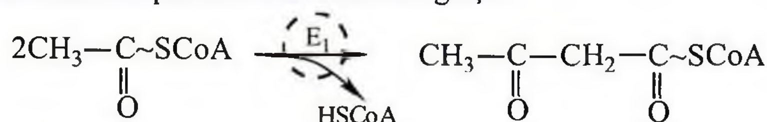
CETOGENEZA

Acetil-CoA, format la oxidarea acizilor graşi, se include în ciclul Krebs în condiţiile în care scindarea lipidelor şi a glucidelor e echilibrată. Cu certitudine este justificată fraza precum că lipidele "ard în flacăra glucidelor"- frază utilizată frecvent de savanţi. Cooperarea acetil-CoA e dependentă de accesibilitatea oxaloacetatului pentru sinteza citratului.

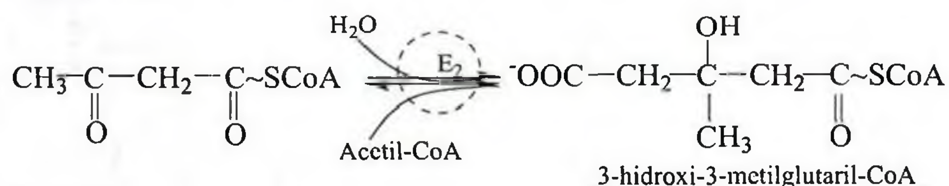
În condiţiile surplusului de grăsimi, soarta acetilului se modifică. În lipsa glucidelor sau la dereglările utilizării lor, concentraţia oxaloacetatului se micşorează. La inaniţie, diabet oxaloacetatul se utilizează pentru generarea glucozei şi nu poate fi condensat cu acetil-CoA. În astfel de condiţii căile de metabolizare recurg la formarea corpilor cetonici: *acetoacetatul, β-hidroxibutirat şi acetonă.*

a) *Acetoacetatul* se formează în trei etape:

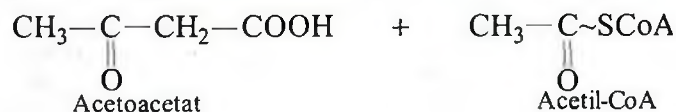
1) Enzima -E_1 e *acetil-CoA-acetil transferază,* ce catalizează o reacţie inversă celei de tioliză în etapa de oxidare a acizilor graşi.



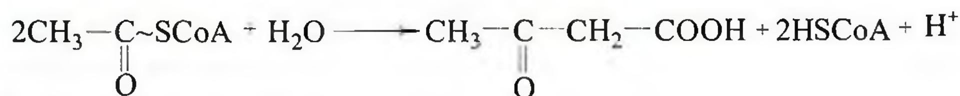
2) E_2 e o *hidroximetilglutaril sintază,* ce conduce la formarea 3-hidroxi-3-metilglutaril-CoA.



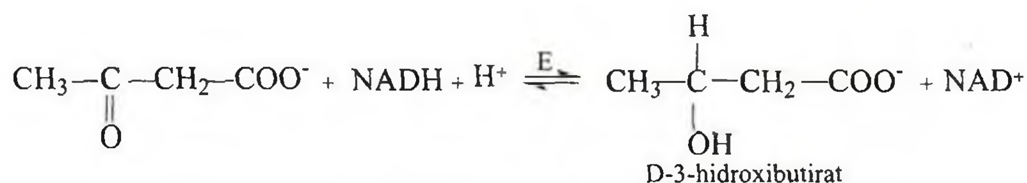
3) Graţie *liazei* (E_3) corespunzătoare, are loc scindarea produsului cu formarea:



4) Reacţia sumară a procesului:



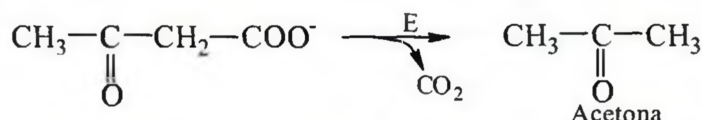
b) În matricea mitocondrială acetoacetatul se reduce la *3-hidroxibutirat.* Raportul dintre aceşti produşi e dependent de relaţia NADH / NAD^+ în mitocondrii. Enzima ce catalizează această reacţie reversibilă e hidroxibutirat dehidrogenaza:



$$CH_3-\underset{\underset{O}{\|}}{C}-CH_2-COO^- + NADH + H^+ \xrightleftharpoons{E} CH_3-\overset{\overset{H}{|}}{\underset{\underset{OH}{|}}{C}}-CH_2-COO^- + NAD^+$$

D-3-hidroxibutirat

c) Acetoacetatul se modifică spontan prin decarboxilare în *acetonă*. Persoanele cu exces de acetoacetat în sînge la expirare emană miros de acetonă.

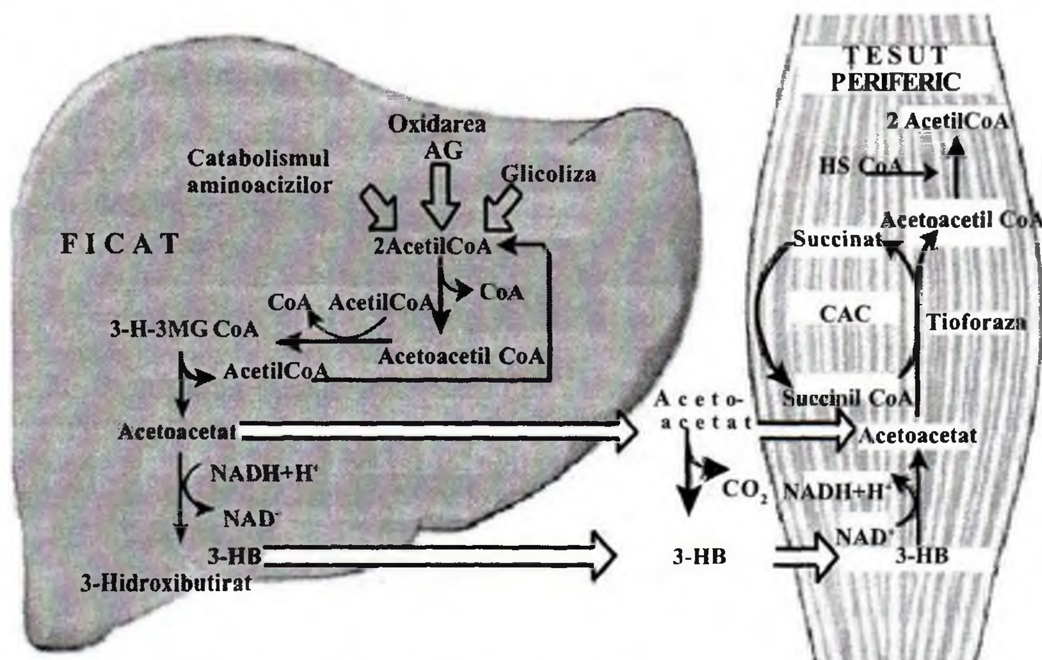


$$CH_3-\underset{\underset{O}{\|}}{C}-CH_2-COO^- \xrightarrow[CO_2]{E} CH_3-\underset{\underset{O}{\|}}{C}-CH_3$$

Acetona

Corpii cetonici generează în ficat, difuzionînd din mitocondrii în sînge şi în ţesuturile periferice.

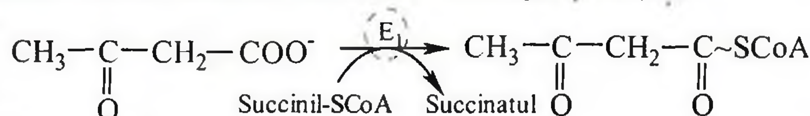
Schematic, sinteza corpilor cetonici în ficat şi utilizarea lor în ţesuturile periferice este redată mai jos.



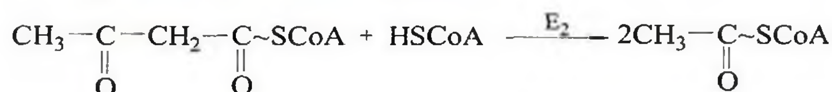
Sinteza corpilor cetonici în ficat şi utilizarea lor în ţesuturile perifirice

Pînă acum cîţiva ani se considera că corpii cetonici sunt doar produse ale scindării, fără vreun rol fiziologic. G. Cahill a demonstrat rolul lor în metabolismul energetic: muşchiul cardiac, stratul cortical al rinichilor preponderent utilizează nu glucoză, ci acetoacetat. Glucoza este o sursă de combustibil pentru creierul oamenilor cu o raţie bine balanţată. În caz de inaniţie ori diabet, creierul se adaptează la utilizarea acetoacetatului. În condiţiile inaniţiei de lungă durată, pînă la 75% din necesitaţile creierului sunt satisfăcute de acetoacetat.

Cetoliza. Acetoacetatul este activat prin transferul HSCoA de la succinil-CoA. Reacția catalizată de o *transferază – CoA specifică* (E_1).



Acetoacetil-CoA este scindat de o *tiolază* (E_2), cu formarea a 2 molecule de CH_3CO~SCoA, utilizate ulterior în ciclul Krebs.



Cetoliza generează ATP prin intermediul ciclului Krebs și al lanțului respirator mitocondrial. Bilanțul energetic net la oxidarea acetoacetatului este de 23 ATP, pe cînd oxidarea unui mol de β-hidroxibutirat generează 26 mol de ATP.

Ficatul asigură celelalte organe cu acetoacetat. El nu posedă enzima trans-CoA - specifică. Așadar, acetoacetatul e o formă solubilă de transport al componentelor acetil. Acetoacetatului i se conferă și rol reglator – cantitățile mari în sînge asigură un surplus de acetil ce micșorează lipoliza în țesutul lipos.

Amintim: CH_3CO~SCoA nu poate fi reutilizat pentru sinteza glucozei, fiindcă nu poate fi convertit în piruvat sau oxaloacetat. Doar atomii de carbon, datorită decarboxilării în ciclul Krebs, sunt eliminați – $2CO_2$.

Acetona poate fi utilizată pe două căi pînă la propandiol (CH_3–CHOH–CH_2OH) și apoi scindată, cu formarea fragmentelor acetil și formil sau grație unei duble hidroxilări (acetol, metilglioxal) este transformată în acidul piruvic.

Mărirea concentrației de corpi cetonici e denumită *cetonemie,* iar apariția lor în urină – *cetonurie*. Situația metabolică asociată cu mirosul acetonei la respirație este considerată drept *cetoză*.

La inaniție, dereglări gastrointestinale la copii sau gravide, ori la glucozurie renală sau la modificări esențiale ale dietei de la obișnuită la cea săracă în glucide și bogată în lipide, – în toate aceste situații se observă amplificarea metabolismului lipidic și diminuarea celui glucidic (incluzînd și diabetul zaharat în care nu are loc utilizarea glucozei), cu apariția *cetozei*. E inhibată resinteza acizilor grași, cu reducerea capacității țesuturilor extrahepatici de a utiliza acetoacetatul, cauzată de amplificarea sintezei lui.

În cetoacidoza diabetică cantitatea corpilor cetonici depășește 20 mmol/L, valorile normale fiind de 3-5 mmol/L.

Consecințele cetozei sunt determinate de caracterul eliminării hidroxibutiratului și acetoacetatului din organism. Fiind anioni la excreție, se pierd și cationii – primordial Na^+. Va rezulta *cetoacidoza*. Concomitent cu sărurile acestor acizi și glucoza la diabetul zaharat, se elimină prin urină și cantități mari de apă, provocînd dehidratarea organismului.

Cetogeneza este diminuată sau absentă în deficiența activității enzimelor implicate în β-oxidarea acizilor grași, cît și micșorarea activității (sau exprimării) HMC – CoA-sintetazei. În ambele situații prelungirea perioadelor interalimentare poate avea consecințe metabolice severe, ce se manifestă prin tulburări neurologice.

BIOSINTEZA LIPIDELOR

Calea de sinteză a acizilor grași nu reprezintă reversibilitatea celei de scindare. E o nouă secvență de reacții ce atestă faptul că căile de degradare și sinteză în sistemele biologice nu sunt identice. *Ce le este în comun și care este diferența între ele?*

1. Sinteza acizilor grași are loc în citozol, scindarea lor – în matricea mitocondrială.

2. Produsele intermediare în sinteză sunt legate covalent de grupele SH a proteinei transportatoare de acil (ACP), pe cînd în procesul scindării acizilor grași aceștia sunt fixați de CoA.

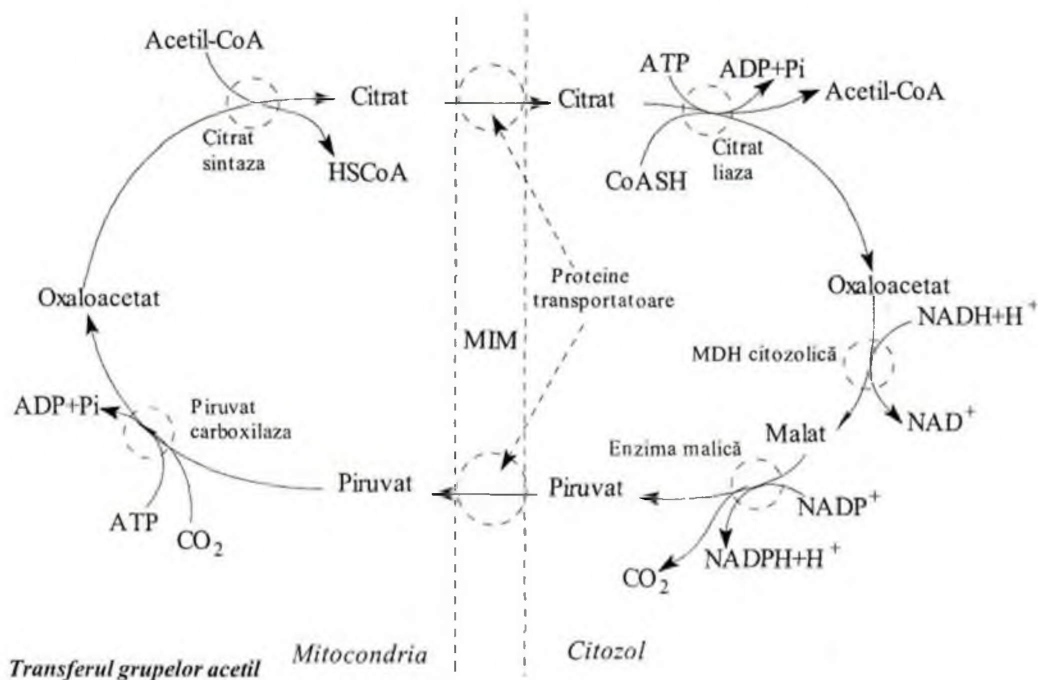
3. Enzimele sintezei acizilor grași la organismele superioare sunt structurate în complex multienzimatic denumit acid gras - sintetază (AGS). Enzimele, catalizînd reacțiile de scindare, nu predispun la asociere.

4. Elongarea catenei acizilor grași e determinată de adiția consecutivă a componentului bicarbonic din acetil-CoA. Donator activ al acestor componente e malonil-ACP. Declanșator în reacția de elongare e detașarea CO_2.

5. Rolul reducător în sinteza acizilor grași îl joacă NADPH.

6. Elongarea, sub acțiunea AGS, se stopează la etapa formării palmitatului (C_{16}). Elongarea ulterioară și formarea legăturilor duble e catalizată de alte sisteme fermentative.

Transferul grupelor acil. Acizii grași sunt sintetizați în citozol, pe cînd acetil-CoA se formează în mitocondrii din piruvat. E necesar transferul lui din mitocondrii în citozol. E vădit că mitocondriile sunt impermeabile pentru acetil-CoA; carnitina transferă acizii grași cu catenă lungă. Ocolirea acestei bariere se realizează cu implicarea citratului ce va deplasa grupele acil prin membrana internă mitocondrială (MIM) – vezi schema de mai jos.



Transferul grupelor acetil

Aşadar, la transferul fiecărei molecule de acetil-CoA din mitocondrii în citozol, se formează o moleculă de NADPH, efectiv necesară pentru sinteza acizilor graşi.

Etapele sintezei acizilor graşi. Un moment decisiv în sinteza acizilor graşi e formarea *malonil-CoA*. A fost demonstrat perfect că pentru sinteză e nevoie de bicarbonat. Sinteza necesită carboxilarea acetil-CoA în malonil, reacţie catalizată de *acetil-CoA-carboxilază*, posedînd drept coenzimă biotina.

Grupa carboxilică a biotinei se fixează covalent de aminogrupa lizinei în carboxilază. Procesul de carboxilare are loc în anumite etape.



$$\text{E-biotina} + HCO_3^- + ATP \longrightarrow \text{E-biotina-}CO_2 + ADP + P_i$$

La această etapă se formează *carboxibiotina* care transferă în etapa următoare CO_2 la acetil-CoA.



$$\text{E-biotina-}CO_2 + CH_3-\underset{\underset{O}{\|}}{C}\sim SCoA \longrightarrow \text{E-biotina} + {}^-OOC-CH_2-\underset{\underset{O}{\|}}{C}\sim SCoA$$

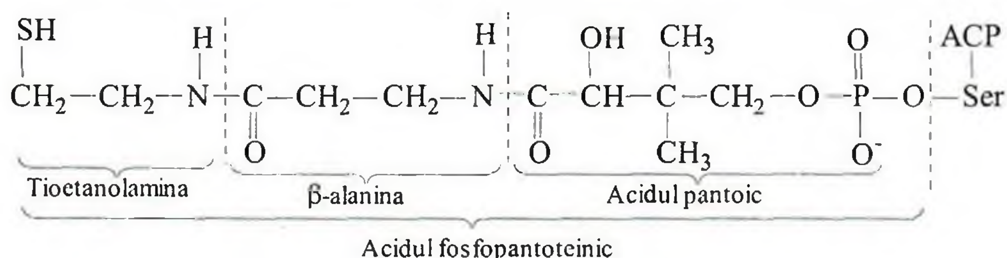
Reacţia enzimatică dată e de tipul "ping-pong" şi constă în faptul că eliberarea unui sau a mai multor produse ale reacţiei are loc pînă la legarea tuturor substraturilor. Enzima e compusă din mai multe subunităţi ce catalizează anumitele reacţii:

a) Biotina este fixată covalent de o proteină mică (22 kDa), denumită *proteină transportatoare de biotină*.

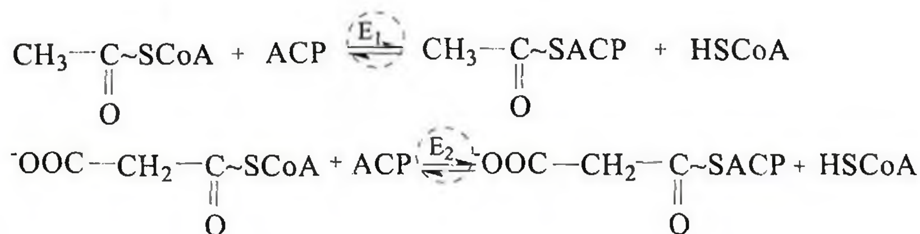
b) Carboxilarea componentului biotinic în complex e catalizată de a doua subunitate – *biotin carboxilază.*

c) Catalizează transferul CO_2 activat de la carboxibiotină pe acetil-CoA o *transcarboxilază* – a treia subunitate. Trecerea enzimei (complexului) în formă activă de polimer fibrilar e reglată alosteric. Reglator principal e citratul care deplasează echilibrul reacţiei spre forma fibrilară, unde se creează condiţii optime de orientare a biotinei spre substrat. Palmitoil-CoA deplasează reacţia spre forma protomeră neactivă.

S-a stabilit că produsele intermediare ale sintezei AG sunt fixate de *proteina transportatoare de acil* prin capătul HS al acidului fosfopantoteinic. Acest component, la scindarea AG, se include în structura CoA, iar la sinteză e legat cu serina în ACP.



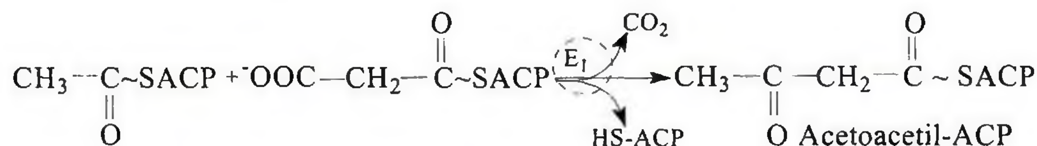
În sinteza acizilor graşi elongarea e precedată de formarea acetil-ACP şi malonil-ACP, reacţii catalizate de *acetil transacilază* (E_1) şi *malonil transacilază* (E_2)



Ultima enzimă e foarte specifică, pe cînd acetil-TA poate transfera şi alte grupe acil, fie chiar şi cu o viteză mai mică. Sinteza AG, cu număr impar de atomi C, începe de la propionil-ACP, sintetizat din propionil-CoA, sub acţiunea acetil-transferazei.

Ciclul de sinteză este urmat de:

Acetil-ACP interacţionează cu malonil-ACP şi formează acetoacetil-ACP. Reacţia de condensare este catalizată de *acil-malonil-ACP* enzimă de condensare (sau *β-cetoacil-ACP-sintază*).

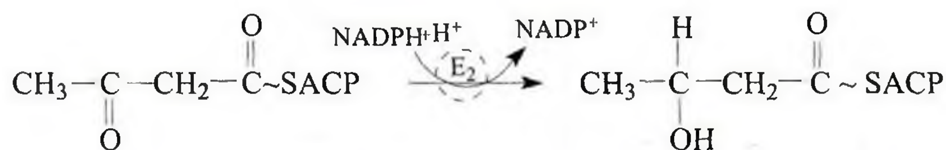


Care este cauza că fragmentul 4 carbonic nu se formează din două secvenţe a cîte doi atomi de carbon fiecare? La sinteza din două molecule de acetil-ACP nu e convenabil echilibrul acestei reacţii, ci e acceptabil pentru participarea malonil-ACP, catalizat de decarboxilarea lui, ceea ce micşorează cu mult nivelul energiei libere. Energia liberă condensată în malonil-CoA, ca rezultat al carboxilării, se degajă la decarboxilare şi e însoţită de sinteza acetoacetil-ACP.

Luînd în considerare faptul că CO_2 e necesar pentru sinteza AG, atomul său de C nu apare în produsul format. Toţi atomii de C din AG cu număr par sunt de origine acetil-CoA.

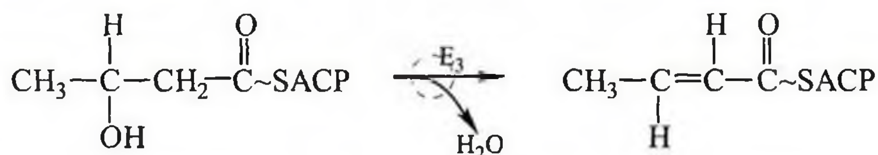
Următoarele trei etape constau în reducerea grupei de pe lîngă atomul C_3 în grupa metilen.

E_2 este *D-3-hidroxibutiril-ACP-reductază.* Această reacţie se deosebeşte de reacţia corespunzătoare în β oxidare prin: a) se formează D, dar nu L-epimerul si b) drept reagent reducător serveşte NADPH, pe cînd la oxidare este utilizat NAD^+.

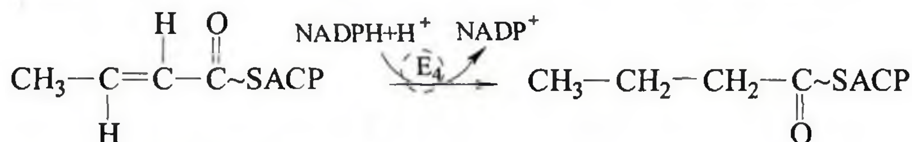


Reacţia ilustrează principiul determinant – în reacţiile de biosinteză este utilizat NADPH, pe cînd în reacţiile de catabolism este generată NADH.

Enzima E_3 – *D-3-hidroxiacil-ACP-dehidrataza* catalizează formarea trans-enoil-ACP (crotonil-ACP)

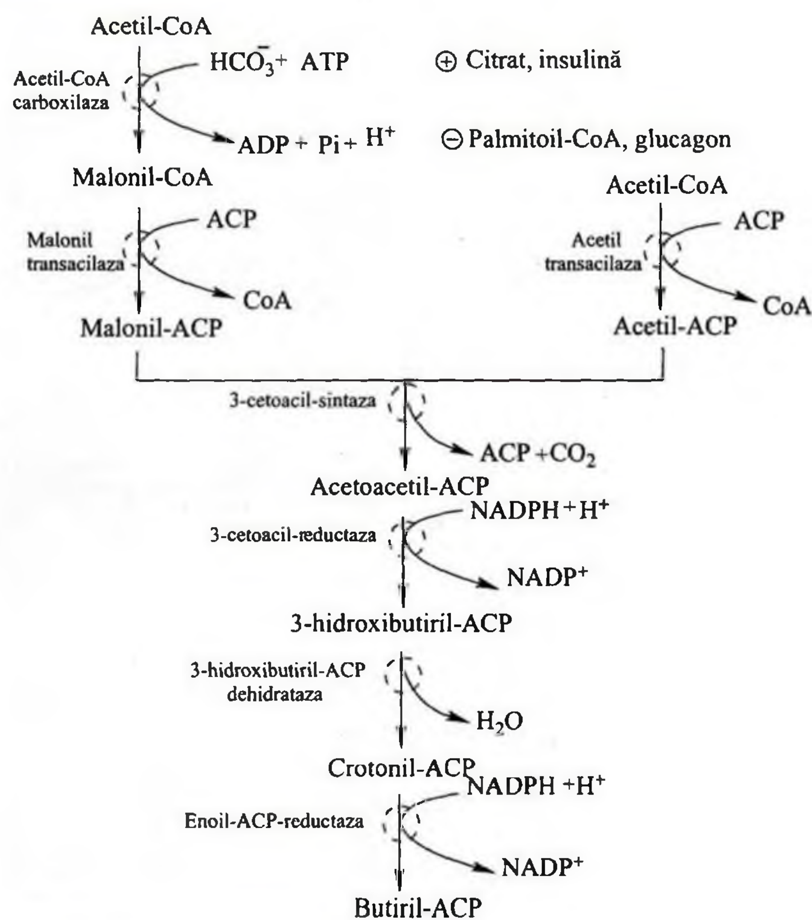


Enzima E_4 – *trans Δ^2-enoil-ACP-reductaza* reduce produsul la butiril-ACP.



În reacția respectivă a β-oxidării este utilizat FAD.

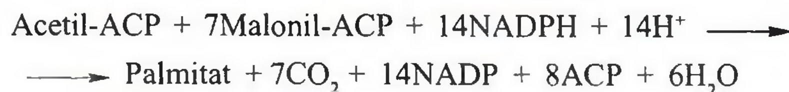
Așadar, primul ciclu de elongare a luat sfîrșit. Cele descrise mai sus schematic pot fi reprezentate în felul următor:



Schema unui ciclu în sinteza acizilor grași

În ciclul următor de sinteză a AG, butiril-ACP se condensează cu malonil-ACP, formînd în final C_6-acil-ACP, care îşi continuă ciclul de sinteză pînă la formarea C_{16}-acil-ACP, ce este hidrolizat, creînd acidul palmitic şi HS-ACP.

Stoichiometria procesului de sinteză a palmitatului:



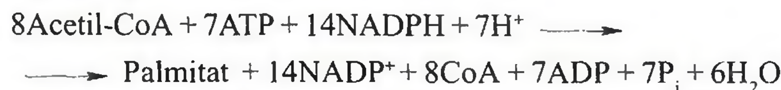
$$\text{Acetil-ACP} + 7\text{Malonil-ACP} + 14\text{NADPH} + 14H^+ \longrightarrow$$
$$\longrightarrow \text{Palmitat} + 7CO_2 + 14\text{NADP} + 8\text{ACP} + 6H_2O$$

Sinteza malonil-CoA necesită:



$$7\text{Acetil-CoA} + 7CO_2 + 7\text{ATP} \longrightarrow 7\text{MalonilCoA} + 7\text{ADP} + 7P_i + 7H^+$$

În final: (ACP = CoA)



$$8\text{Acetil-CoA} + 7\text{ATP} + 14\text{NADPH} + 7H^+ \longrightarrow$$
$$\longrightarrow \text{Palmitat} + 14\text{NADP}^+ + 8\text{CoA} + 7\text{ADP} + 7P_i + 6H_2O$$

Ce reprezintă acid gras sintaza? Este un complex multienzimatic cu masa mai mare de 400 kDa, formînd două subunităţi, fiecare fiind codificată de o anumită genă.

Subunitatea A conţine β-oxiacil-sintază, β-oxiacil-reductază şi tioesterază; proteina transportatoare de acil este ataşată tot la această subunitate.

Subunitatea B: acetil transacilază, malonil transacilază, β-hidroxiacil-ACP -dehidratază, enoil-ACP-reductază. AGS funcţionează sub forma unui dimer – gruparea ACP-SH a unui monomer conlucrează cu gruparea cis-SH a celuilalt monomer (HS-cisteină din β-cetoacil sintază) (fig.5.20).

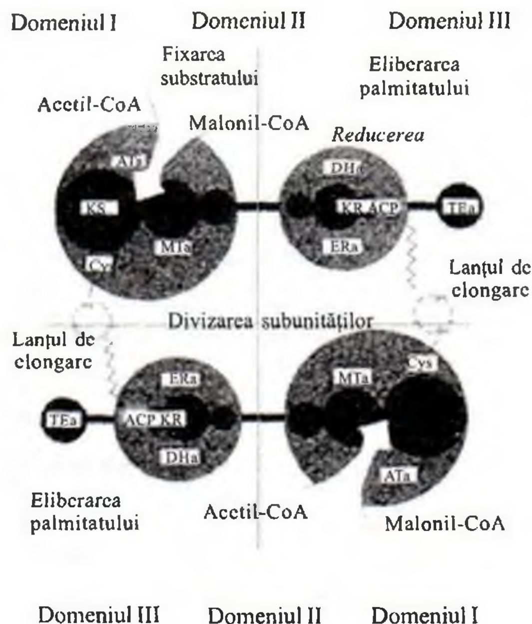


Figura 5.20. ***Complexul enzimatic AGS din ficatul animal***

ATa - acetil transacilaza; KS - 3-cetoacil-sintaza; TEa - tioesteraza; KR -3-cetoacil-reductaza; MTa - malonil transacilaza; ERa - enoil-ACP-reductaza. DHa -3-hidroxi-butiril - ACP - dehidrataza;

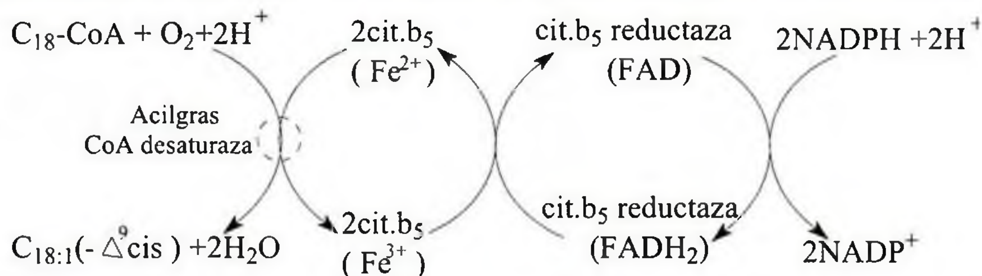
Avantajele acestor complexe multienzimatice sunt evidente, dar e cazul să le mai nominalizăm o dată:

1. Contact perfect fără transformări structurale esenţiale.
2. Transfer direct al intermediatorilor de la un centru activ la altul.
3. Compuşii nu diseminează în citozol şi n-au nevoie să se caute.
4. Compuşii sunt izolaţi şi protejaţi de reacţii concurente.

Evident că transferul a 8 molecule de acetil-CoA din mitocondrii în citozol e însoţit şi de formarea a 8 NADPH. Cele 6 NADPH necesare pentru sinteza palmitatului generează în calea pentozo-fosfaţilor.

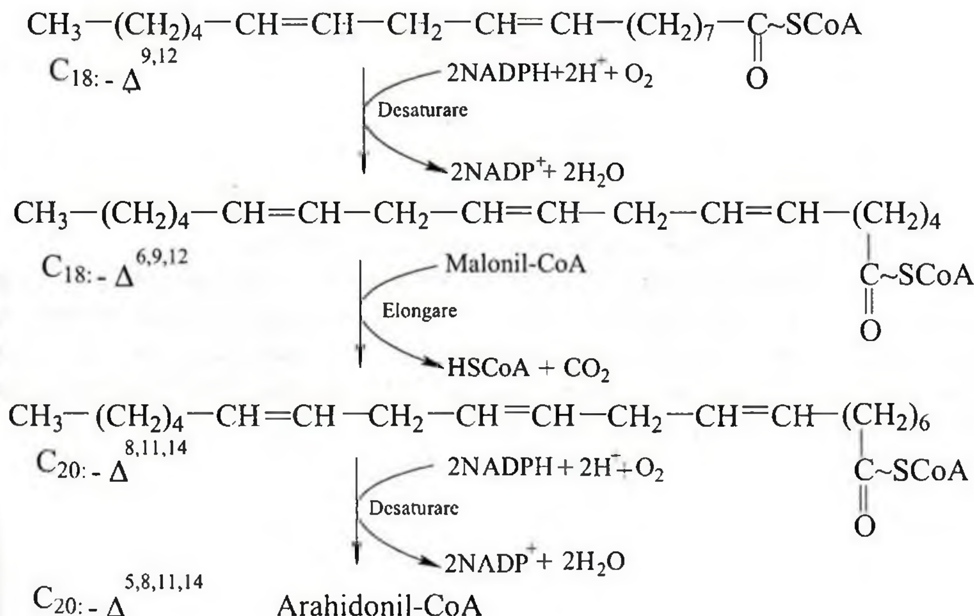
Biosinteza acizilor graşi cu catena mai lungă şi a celor nesaturaţi. La eucariote acizii graşi cu catena mai lungă se obţin prin elongarea acidului palmitic sau a altor acizi exogeni. Au loc, graţie sistemelor enzimatice fixate de membranele reticulului endoplasmatic, sisteme microzomale care ataşează la acidul preexistent unităţi C_2, furnizate de malonil-CoA şi ataşate la capătul carboxilic al acizilor saturaţi şi nesaturaţi.

Sistemele microzomale catalizează şi formarea legăturii duble în compuşii CoA a acizilor graşi cu catenă lungă. Capacitatea de a sintetiza acizi graşi nesaturaţi e limitată. Pot fi sintetizaţi acizii graşi monoetilenici. Introducerea unei legături duble are loc graţie unei *monooxigenaze*, care cooptează gruparea OH, urmată de dehidratare.



Acest sistem favorabil combinării reacţiilor de elongare şi desaturaţie conferă introducerea legăturii duble între cea precedentă şi gruparea COO^-. Mamiferele nu posedă sisteme enzimatice, ce ar cataliza formarea legăturii duble dincolo de C_9. De aceea nu pot fi sintetizaţi acizii linoleic (18:2 cis-Δ^9,Δ^{12}) şi linolenic (18:3) - cis-Δ^9, Δ^{12}, Δ^{15}). Ei sunt acizi graşi indispensabili la sinteza fosfolipidelor, esterilor colestorului, prostaglandinelor. Pot fi obţinuţi numai pe cale exogenă, deoarece reprezintă AG nutritivi esenţiali.

Acidul linoleic se transformă în acid arahidonic conform reacţiilor:



Viteza de sinteză e determinată de viteza reacției catalizate de acetil-CoA-carboxilaza, cu reglatorul său alosteric – citratul. Sinteza AG atinge apogeul în condițiile surplusului de glucide şi conținutului redus de AG. Concentrația citratului e mare cînd avem în surplus acetil-CoA şi ATP. Antagonistul citratului, cu efect asupra acetil-CoA carboxilazei, este palmitoil-CoA, care se acumulează în surplusul de AG. El poate să inhibe funcția proteinei transportatoare de citrat din mitocondrii în citozol şi e în stare să diminueze generarea NADPH, inhibînd G-6-P-dehidrogenaza în ciclul pentozo-fosfaților. Controlul adaptiv de durată tardivă e determinat de viteza sintezei şi a degradării enzimelor participante la sinteza acizilor graşi.

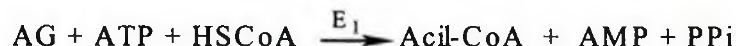
Un aport exagerat alimentar care depăşeşte necesitățile energetice ale organismului stimulează excesiv biosinteza acizilor graşi. Excesul de glucide, alcool, proteine conduce la steatoza hepatică (degenerescența grasă a ficatului), obezitate, hipertrigliceridemia familială endogenă (IV). Deficitul ereditar al acetil CoA carboxilazei, cît şi al biotinei deregleazǎ biosinteza acizilor graşi, vizînd un tablou clinic sever.

Biosinteza triacilglicerolilor

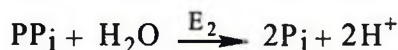
Acizii graşi, atît endogeni cî şi exogeni sunt activați în prezența HSCoA în acil CoA sub acțiunea acil CoA-sintetazei. Există trei izoforme ale enzimei (vezi mai sus). Celulele hepatice, spre deosebire de adipocite, pot utiliza glicerolul de diferită proveniență (endo- sau exogenă). Glicerol kinaza prezentă numai în ficat, fosforilează glicerolul, rezultant al dijestiei TAG alimentare, absorbției şi captării lui.

Biosinteza necesită prezența unor precursori comuni: glicerol-3-fosfat, CoA acil. Sursele acestor rezultante pot fi:

1) Glicerol-3-fosfatul, ca rezultat al glicolizei sau sintetizat din glicerol şi ATP, reacție catalizată de *glicerol kinază.*



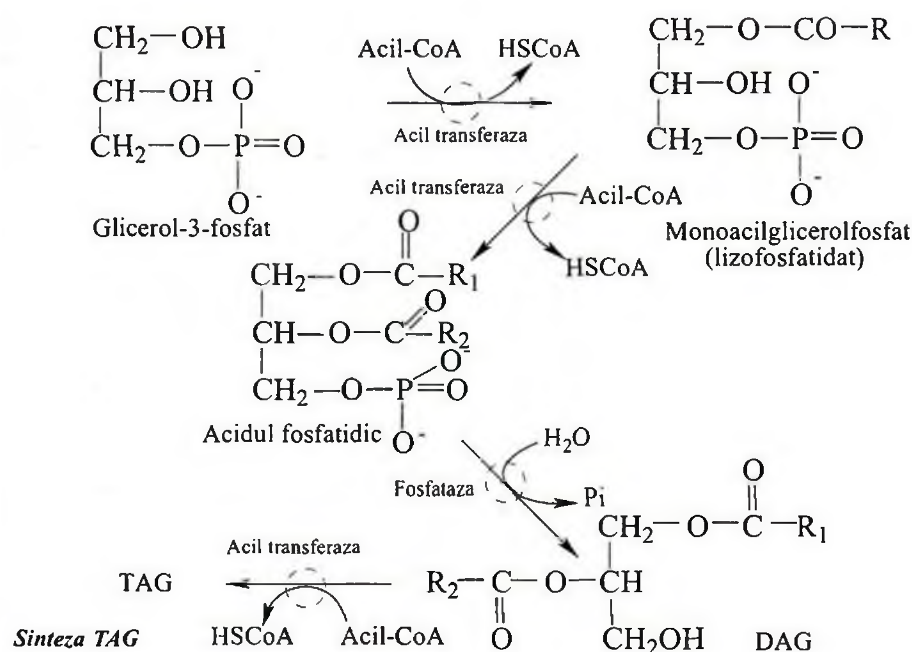
$$AG + ATP + HSCoA \xrightarrow{E_1} Acil\text{-}CoA + AMP + PPi$$



$$PP_i + H_2O \xrightarrow{E_2} 2P_i + 2H^+$$

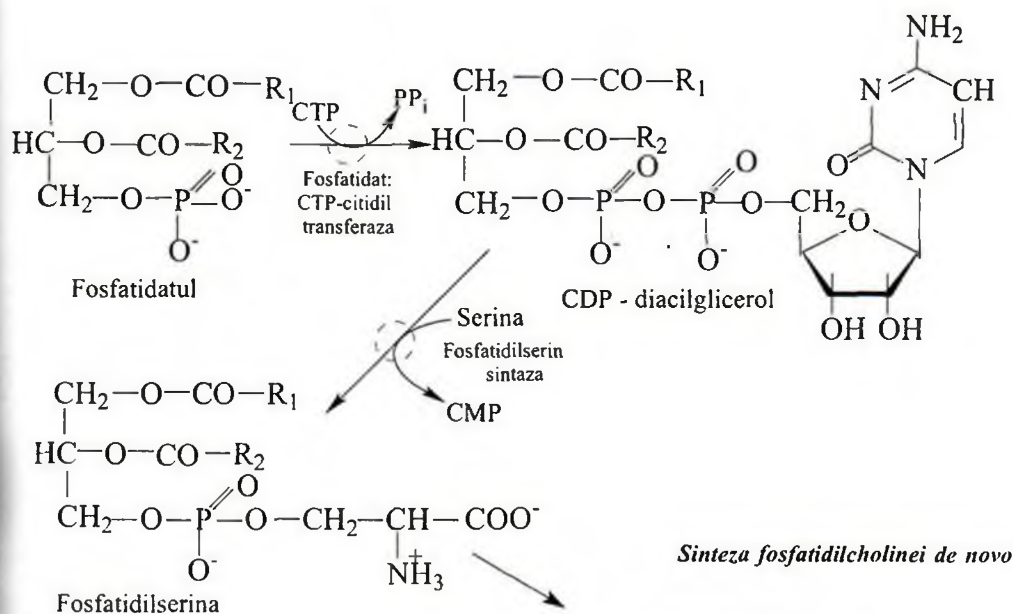
2) CoA esterii AG, prin intermediul acil-CoA-sintetazei.

Sinteza triacilglicerolilor este redată mai jos. Enzimele E_1,E_2 şi E_3 sunt glicerol-fosfat-acil transferaze. Enzimele respective sunt asociate într-un complex fixat de membrana - TAG-sintază. Pentru sinteză, TAG - fosfatidatul este hidrolizat de o fosfatază specifică, cu formarea diacilglicerolului care este acilat, formînd TAG în urma reacției catalizate de diacilglicerolacil transferază E_3.

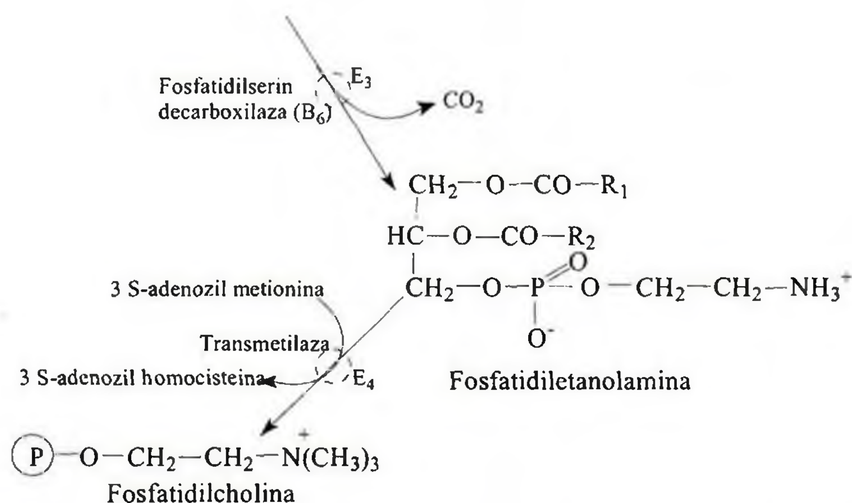


Biosinteza lipidelor membranare. Sinteza de novo (din precursori) a fosfatidelor utilizează ca intermediar acidul fosfatidic, care interacționează cu CTP, formînd CDP-DAC; la condensarea cu serina rezultă fosfolipidul fosfalidilserina, care, fiind decarboxilat, finalizează cu fosfalidiletanolamina.

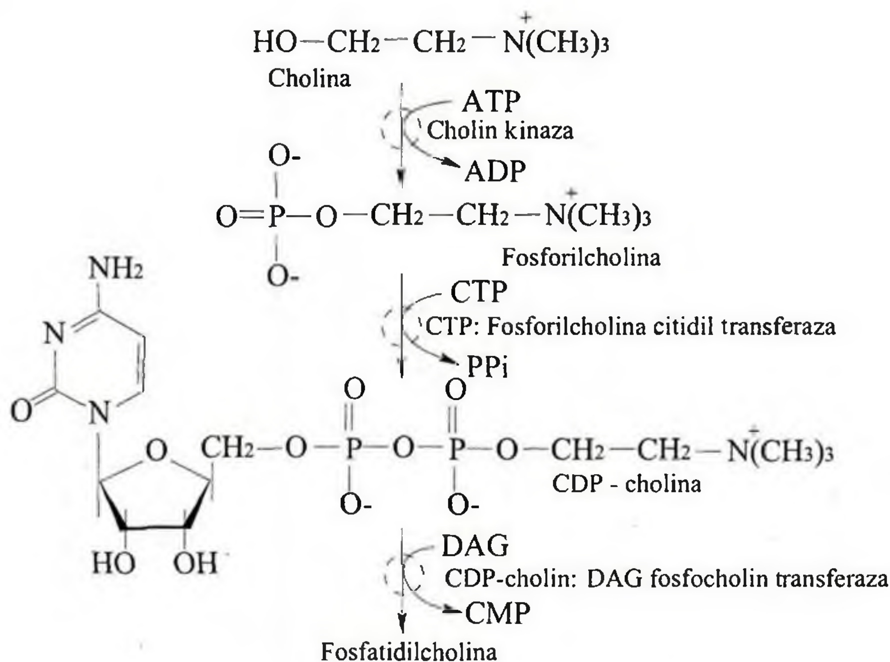
Aminogrupa fosfatidiletanolaminei se metileaza de trei ori, în calitate de donator servind S-adenozilmetionina (SAM), formînd fosfatidilcholina.



Sinteza fosfatidilcholinei de novo



O altă cale de sinteză a fosfolipidelor utilizează cholina (*calea de rezervă*), constituind o sinteză din produse formate. Cholina este fosforilată de kinază prin ATP, formînd fosforilcholina, apoi utilizînd CTP şi DAG se sintetizează fosfatidilcholina.

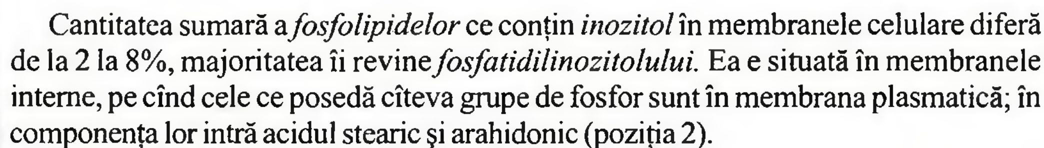


Sinteza fosfatidilcholinei

Schema sintezei fosfolipidelor membranare este redată mai jos.

SAN -S-adenozil homocisteina
SAM -S-adenozil metionina

Lizofosfatidat
Acil-CoA
CoA
Fosfatidat
H_2O
Pi
CTP
PPi
diacilglicerol
CDP-diacilglicerol
CDP-etanolamina
CMP
CDP-cholina
CMP
G-3-P
CMP
Inozitol
CMP
Fosfatidil-etanolamina
3SAM
3SAH
Fosfatidil-cholina
Fosfatidil-glicerol
Fosfatidil-inozitol
Serina
Etanolamina
Fosfatidilserina
CMP
Cardiolipina


Cantitatea sumară a *fosfolipidelor* ce conțin *inozitol* în membranele celulare diferă de la 2 la 8%, majoritatea îi revine *fosfatidilinozitolului.* Ea e situată în membranele interne, pe cînd cele ce posedă cîteva grupe de fosfor sunt în membrana plasmatică; în componența lor intră acidul stearic şi arahidonic (poziția 2).

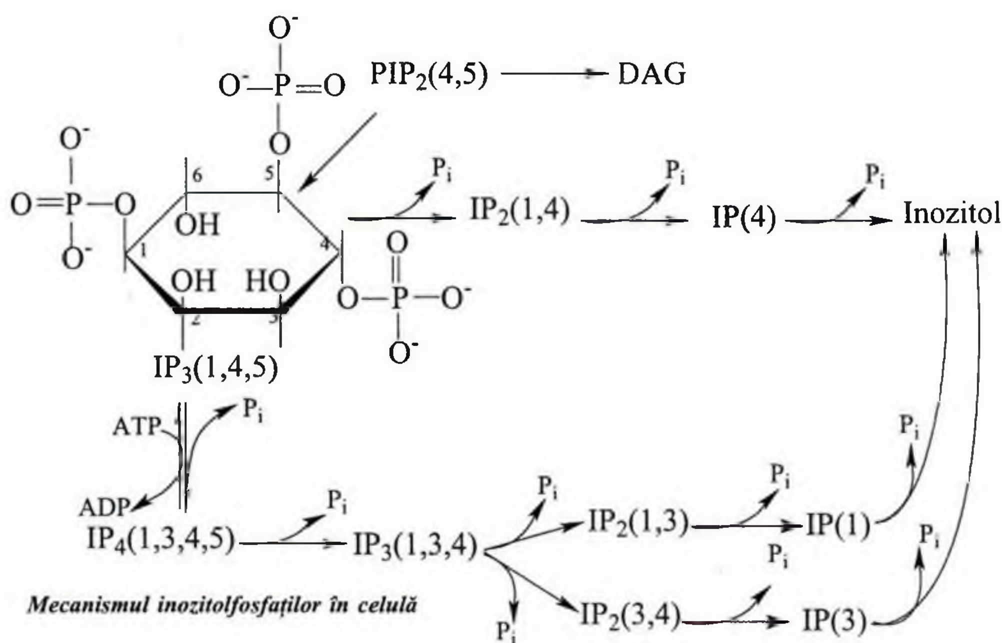
Apreciind rolul acestui fosfolipid ca mesager secundar hormonal, vom reda căile principale de metabolism.

CMP
CDP–DAG
PPi
CTP
PA
ADP
ATP
DAG
$C_{18:0}$
$C_{20:4}$
ATP
ADP
PIP(4)
ATP
ADP
$PIP_2(4,5)$
Pi
Pi
Inozitol
PI
Pi
Pi
Pi
IP(4)
$IP_2(1,4)$
$IP_3(1,4,5)$

Metabolismul fosfatidilinozitolului

În celule transformările $IP_3(1,4,5)$ sunt cauzate de 2 enzime: 5-fosfataza (E_1) şi 3-kinaza (E_2) ce catalizează fosforilarea ATPd a inozitoltrifosfatului în poziția 3.

Schema de mai jos ilustrează metabolizarea inozitoltrifosfaţilor în celulă.



Mecanismul inozitolfosfaţilor în celulă

5-fosfataza posedă mai multe izoforme atît fixate de membrană, cît şi solubile în citozol. 3-kinaza este specifică pentru IP_3 (1,4,5), avînd o afinitate mare la acest substrat. Ea se activează sub influenţa Ca^{2+} şi este modelată de calmodulină.

Formarea IP_4(1,3,4,5) şi a metabolitului IP_3(1,3,4) se înregistrează în celule la acţiunea hormonilor, ce măresc concentraţia Ca^{2+} plasmatic. Pe această cale are loc nu numai anihilarea semnalului hormonal ce măreşte conţinutul Ca^{2+}, dar şi formarea compuşilor inozitolului care determină anumite funcţii biologice, reglînd astfel torentul Ca^{++} în celulă şi depozitarea sa.

Sinteza sfingolipidelor. Procesul parcurge cîteva etape: condensarea serinei cu palmitoil-CoA, cu formarea rezultantelor. Recent, s-a stabilit că sfingozina liberă se formează din ceramidă, ca rezultat al hidrolizei de către ceramidază, dar nu în consecinţa oxidării sfingoninei de flavoproteid. Actualmente, schema metabolismului sfingolipidelor ar fi următoarea (fig.5.21).

Sfingofosfatidele (sfingomielinele), deşi se găsesc în toate membranele celulelor eucariote, apar în cantităţi mari în teaca de mielină a axonilor ţesutului nervos, în cantităţi mai mici în ficat, muşchi, splină etc. Sfingomielinele se deosebesc între ele după acidul gras din compoziţia lor. Predominanţi în ele sunt radicalii acil, ce aparţin acidului palmitic şi stearic. Acidul nervonic ($C_{24:1}$) şi behenic ($C_{20:0}$) se decelează cu o frecvenţă mai mică în aceşti compuşi. Toate etapele de sinteză a ceramidei se desfăşoară pe suprafaţa citozolică a membranelor reticulului endoplasmatic.

O cale alternativă de sinteză a sfingomielinei cuprinde donarea radicalului de fosfocholină de la fosfatidilcholină. Reacţia dintre ceramidă şi CDP-etanolamină poate să conducă la ceramid-fosfoetanolamină.

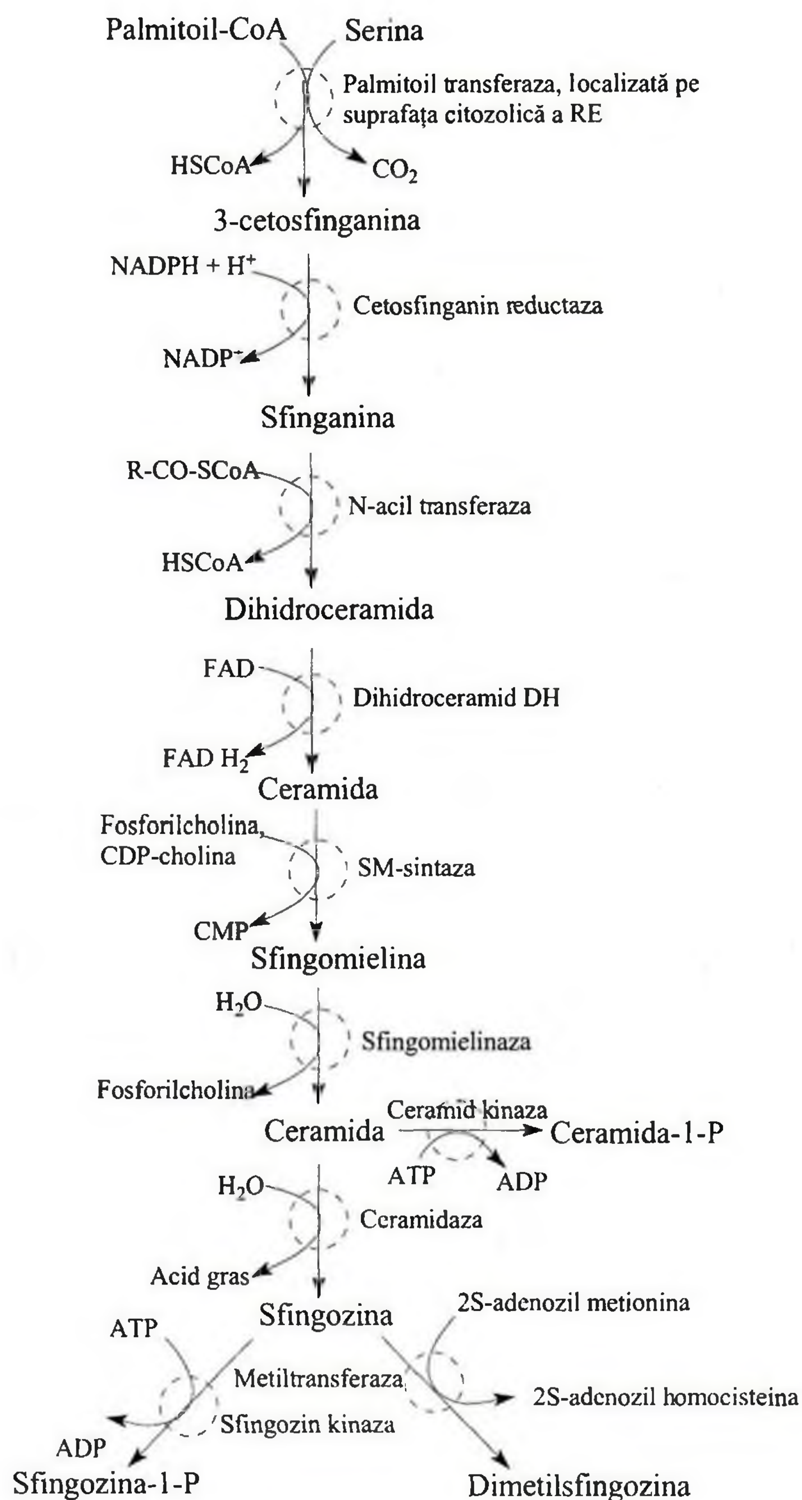
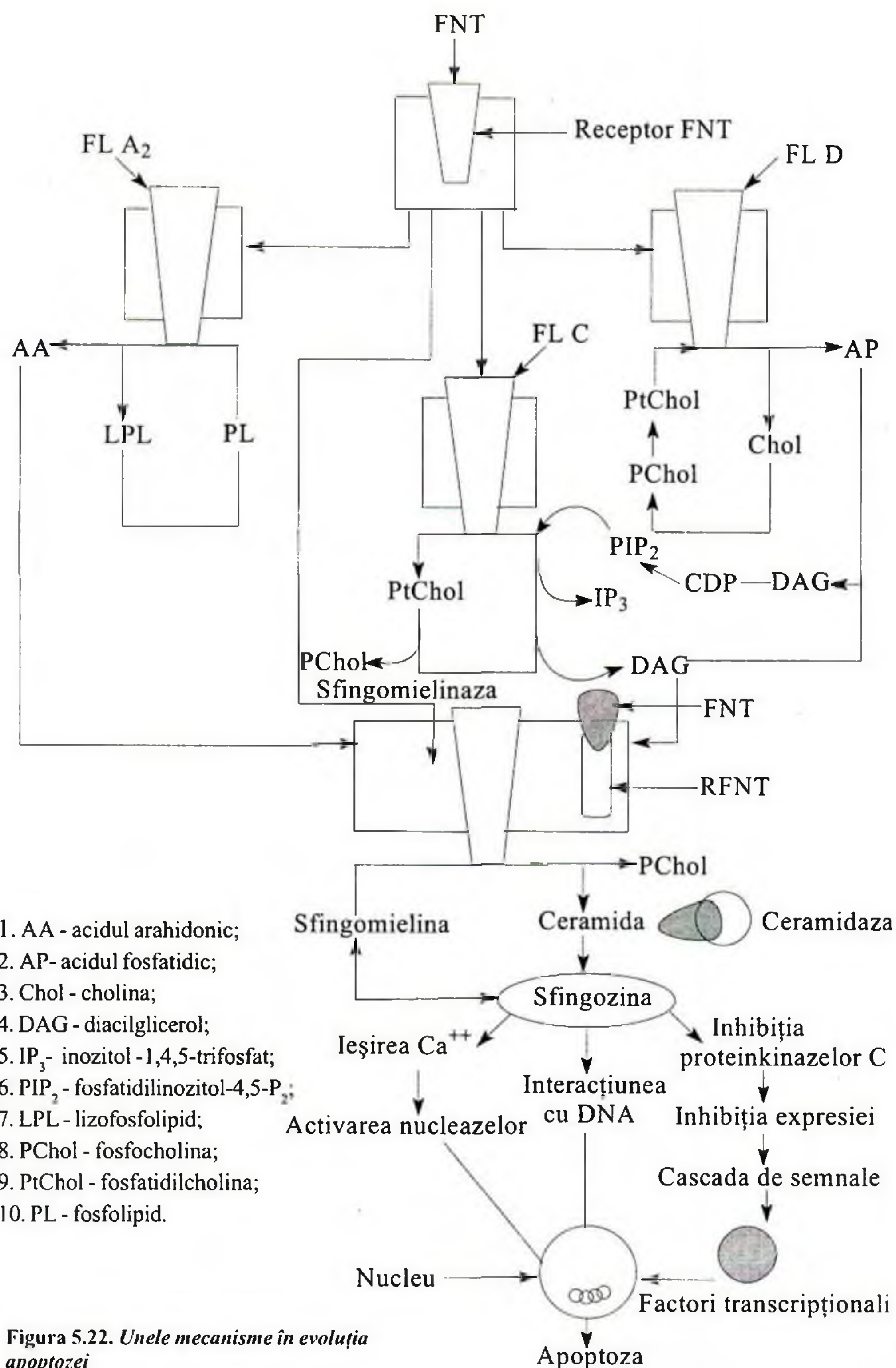


Figura 5.21. ***Metabolismul sfingolipidelor***



1. AA - acidul arahidonic;
2. AP- acidul fosfatidic;
3. Chol - cholina;
4. DAG - diacilglicerol;
5. IP_3- inozitol -1,4,5-trifosfat;
6. PIP_2 - fosfatidilinozitol-4,5-P_2;
7. LPL - lizofosfolipid;
8. PChol - fosfocholina;
9. PtChol - fosfatidilcholina;
10. PL - fosfolipid.

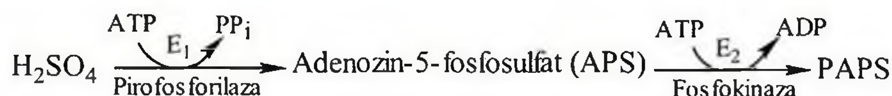
Figura 5.22. ***Unele mecanisme în evoluţia apoptozei***

Sfingozina influențează activitatea multiplelor sisteme fermentative în celule. Un rol deosebit este determinat de capacitatea de inducție a apoptozei – moartea programată a celulelor. Acest proces stă la baza apărării organismului de infecțiile virale, imunodeficitului în SIDA-infecții, morții celulelor la radiație și sub influența glucocorticoizilor.

Apoptoza indusă prin receptorii FNT (factorul necrotic tumoral) se studiază intensiv, fiind determinată de rolul biologic vădit. E stabilit că componența lipidică a membranei plasmatice în care sunt situați acești receptori joacă un rol esențial în transmiterea semnalului apoptozei în nucleu. Fosfolipidele sunt sursa mesagerilor secunzi, ce reglează activitatea enzimelor apoptozei: proteinkinazele, fosfatazele și proteazele. Interacțiunea moleculelor-semnal cu receptorii induc activitatea enzimelor lipolitice (fosfolipazele A,C,D și a sfingomielinazei), cu acumularea ulterioară a compușilor hidrolizei (a. arahidonic, DAG, ceramidei etc.), care iau parte la transmiterea semnalului indus de FNT. Dar numai produsele ciclului sfingomielinei (ceramida și sfingozina) posedă acțiune proapoptotică la contact cu celula. Acidul arahidonic, acidul fosfatidic, DAG activează enzima - sfingomielinaza și în final induc acumularea produselor toxice ale ciclului sfingomielinei. Acest mecanism e ilustrat în fig. 5.22.

Glicosfingolipidele acoperă 5-10% din lipidele membranei plasmatice, în care îndeplinesc roluri majore. În procesele de sinteză se utilizează formele active ale glucozei (UDP-β- D-glucoza) sau galactozei (UDP-β-D-galactoza). Glucozil sau galactozil transferazele respective au o activitate intensă în perioada de mielinizare a sistemului nervos.

Sulfatidele (galactocerebrozid-3-sulfatul) se sintetizează, utilizînd PAPS (3′-fosfoadenozin - 5′-fosfosulfat) care însuși este format prin următoarea secvență de reacții.

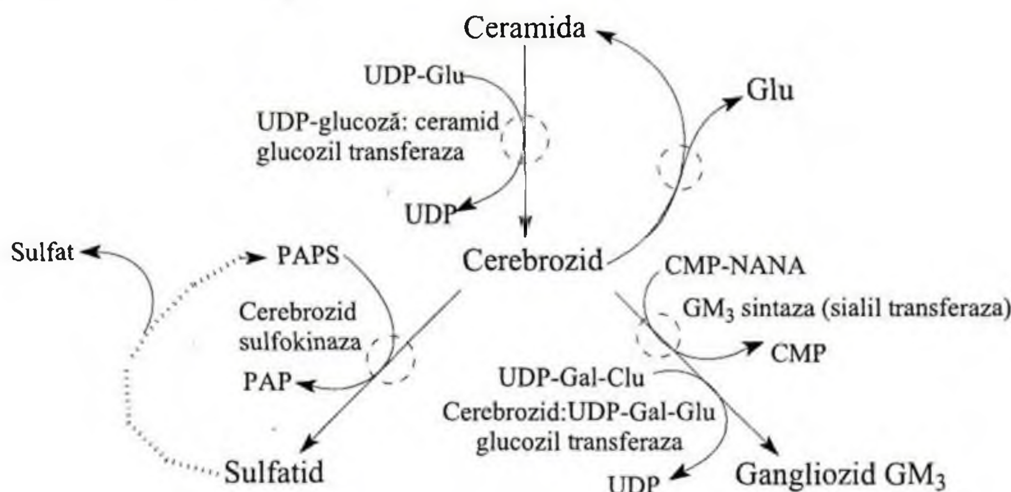


Reacția de sinteză a *sulfatidelor* este catalizată de galactocerebrozid sulfokinază. Sulfatidele alcătuiesc 15% din lipidele substanței albe a creierului.

Cele mai complexe glicosfingolipide sunt *gangliozidele*. Componenți ubicuitari ai membranelor celulare, ele se găsesc în cantități variabile și au o repartiție diversă în toate țesuturile organismului uman și animal, cu o concentrație avansată în țesuturile nervoase. Fiecare tip de celulă are un profil al său gangliozidic, care se modifică în timpul embriogenezei. Fiind localizate pe partea externă a membranei plasmatice, ele sunt ancorate prin intermediul componenței ceramidice, iar porțiunea lor oligoglucidică este orientată spre mediul extracelular.

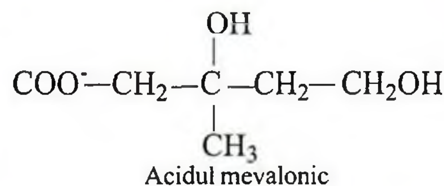
Biosinteza gangliozidelor se realizează în aparatul Golgi prin adiția secvențială a monoglucidelor activate la lactozilceramidă. Adiția ultimilor, cît și a acizilor sialici (NANA) este controlată de enzime specifice: galactozil transferaze, sialil transferaze, N-acetilgalactozaminil-, N-acetilglucozoaminil transferaze. Enzimele date posedă o specificitate relativă față de substraturi.

Ceramida este sursa de sinteză a cerebrozidelor, sulfatidelor şi a gangliozidelor, conform schemei de mai jos.



METABOLISMUL COLESTEROLULUI

Colesterolul este nu doar un component primordial al membranelor celulare şi al lipoproteinelor plasmei sîngelui, dar şi un precursor al multiplilor steroizi biologici – acizilor biliari, al diferitor hormoni steroizi. Colesterolul se conţine numai în alimente de origine animală (gălbenuşul de ou, carnea, ficatul, lactatele şi derivaţi ai acestora). Esterii lui sunt hidrolizaţi de colesterol esterază pancreatică, apoi e absorbit în faza micelară, capacitatea de absorbţie a colesterolului fiind limitată (300 mg). Aportul normal (800 mg – sinteza endogenă) compensează pierderea inevitabilă prin eliminarea intestinală a acizilor biliari.



Acidul mevalonic

Se sintetizează colesterolul din acetil-CoA care spre deosebire de sinteza AG, se unesc în moleculă în alt mod. Această concluzie este confirmată de experimentele asupra animalelor hrănite cu acetat marcat – carbonul e radioactiv în grupa CH_3 şi în grupa COOH. Colesterolul marcat a fost extras din ţesuturile animalelor. Scindarea lui în etape secvenţionale, cu determinarea radioactivităţii produselor, a permis stabilirea locului atomilor de C marcaţi de provenienţă metilică sau carboxilică. Informaţia a contribuit la elucidarea secvenţei reacţiilor fermentative în procesul de sinteză a colesterolului, ce are loc în cîteva etape. Principalul organ de metabolizare a colesterolului este ficatul, dar are loc şi în intestin, suprarenale, tegumente, etc.

În etapa I se sintetizează acidul mevalonic – fondul citoplasmatic de 3-hidroximetil-glutaril produce mevalonatul utilizat în sinteza colesterolului.

În etapa II mevalonatul adiţionează 3 grupe fosfat, ulterior pierde gr. COOH, un rest fosfat şi 2 atomi de H^+, formînd Δ^3-izopentenil pirofosfat – forma activă a unităţii izoprenice.

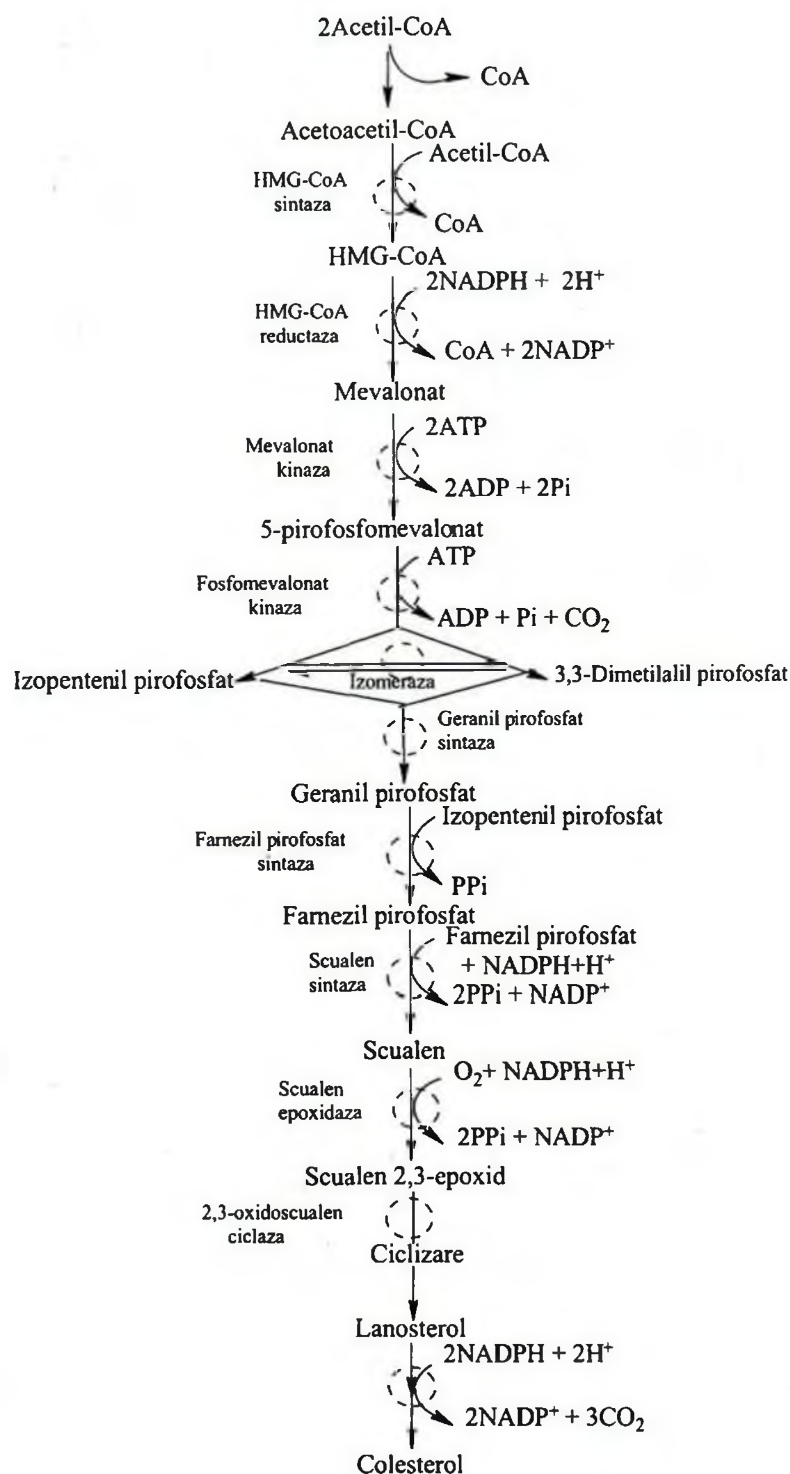


Figura 5.23. ***Sinteza colesterolului***

În etapa III are loc condensarea şi izomerizarea a 6 molecule de izopentenil pirofosfat, cu formarea unei hidrocarburi denumită scualen. Apoi el se supune ciclizării şi formează lanosterolul, primul compus steroidic (IV). Această etapă necesită O_2 molecular. În final, lanosterolul se transformă în colesterol (etapa V) (fig.5.23).

Sinteza colesterolului este un proces anabolic, ce necesită un aport energetic deosebit: 18 moli de acetil-CoA şi 18 moli de ATP. Concentraţia $NADP^+$, H^+ este furnizată de ciclulu pentozo-fosfat şi de naveta citrat-piruvat.

Pentru descifrarea acestei căi originale de biosinteză, cea mai complicată dintre cele cunoscute, americanul K. Bloch, neamţul F. Lynen şi englezul J. Cornforth, în 1961, se învrednicesc de premiul Nobel. Colesterolul ca substanţă apare numai după ce atmosfera pămîntului a devenit aerobă. Colesterolul e propriu eucariotelor, dar nu şi procariotelor. Numai colil-CoA (activată - grupa COOH) poate fi conjugat cu glicină sau taurină.

Reglarea biosintezei colesterolului

Reacţia - limită a biosintezei e formarea acidului mevalonic, catalizată de o enzimă compusă reglatoare – *hidroximetil-glutaril-CoA reductază.* Enzima este inhibată de mevalonat şi de colesterol, se localizează în reticulul endoplasmatic şi în formă activă are stare nefosforilată – în stare fosforilată e inactivă (fig.5.24).

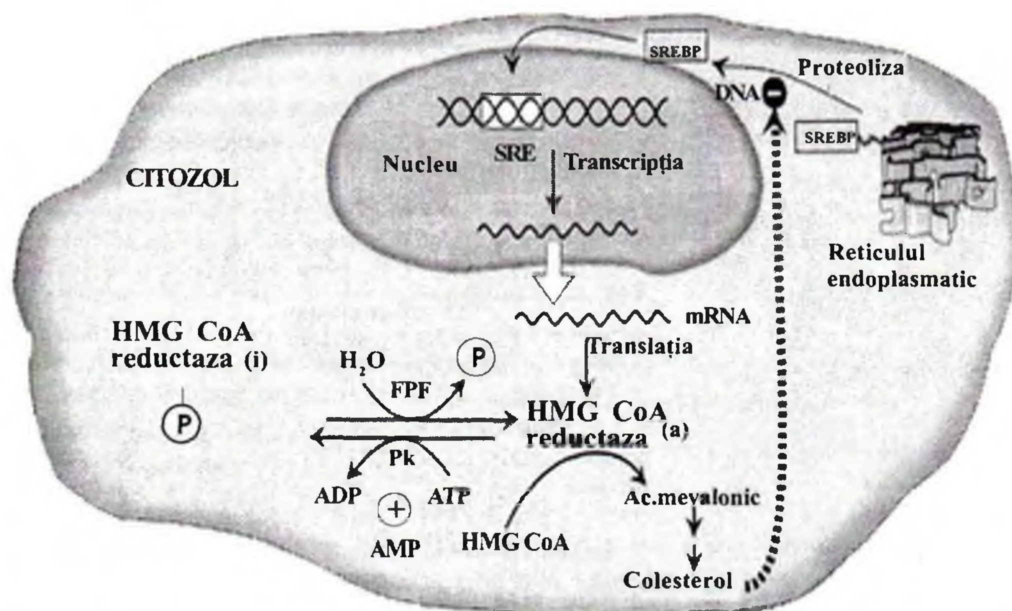


Figura 5.24. ***Reglarea HMG CoA reductazei. SRE – segment reglator al sterolului, SREBP – proteina fixatoare de SRE, FPF—fosfoprotein fosfataza***

Reglarea e dependentă şi de concentraţia proteinei specifice ce transportă colesterolul. Sunt caracterizate 8 tipuri de apoproteine, care solubilizează intens lipidele hidrofobe, posedă semnale care reglează transferul lipidelor în ţesuturile specifice - ţintă şi ieşirea lor din ele.

La fixarea lipoproteinelor plasmei, ce conţin colesterol cu receptori corespunzători pe suprafaţa celulelor, biosinteza colesterolului se inhibă.

Viteza de sinteză e dependentă şi de conţinutul altor steroizi în ţesuturi. Hormonii de tipul insulinei şi hormonii tireoidieni activează enzima HMG-CoA reductaza, iar glucagonul la animale are efect antagonist. Unele statine ca: *simvastatina, lovastatina* şi *mevastatina* au o structură asemănătoare cu HMG-CoA şi sunt inhibitori reversibili ai HMG-CoA reductazei. Aceşti compuşi micşorează nivelul plasmatic al colesterolului.

Conţinutul colesterolului depinde de regimul alimentar. Acest colesterol alimentar frînează sinteza *reductazei în ficat şi inactivează moleculele de enzimă* din ţesut.

HMG



Structuri similare Simvastatina

Celulele extrahepatice şi ale intestinului recepţionează colesterolul din serul sanguin. Sursa principală sunt lipoproteinele de densitate mică – celulele nu-l sintetizează *de novo*.

Înglobarea colesterolului în celulele din lipoproteinele de densitate mică (LPDM - LDL) include următoarele etape (fig. 5.25):



Figura 5.25. ***Transformările LDL în cultura fibroblaştilor omului***

a) LP sunt fixate de receptorii specifici pe membranele celulelor. Receptorii se postează în anumite locusuri, numite adîncituri cu chenar; interacționează prin intermediul apo-β- proteinelor și necesită Ca^{2+}. Numărul de receptori pe un anumit tip de celulă variază și este reglat printr-un mecanism de retroinhibiție de concentrația LP în spațiul extracelular.

Gropițele specifice conțin o proteină, numită *clatrină* (180 kDa), care, împreună cu o altă proteină (65kDa) formează o structură cu o conformație foarte caracteristică – elementul structural de bază e complexul proteic trivalent, denumit trischelion (3 clatrine și 3 proteine mai mici).

b) Complexul receptor – LP – este translocat în celule prin endocitoza absorbțională, formînd o bulă endocitară.

c) Fuzionarea cu lizozomi, unde proteinele sunt hidrolizate pînă la aminoacizi; esterii colesterolului sunt hidrolizați de lipaza acidă.

d) Colesterolul liber poate fi utilizat în biosinteza membranelor, reesterificat pentru depunerea în celulă – reacție catalizată de o *acil-CoA-colesterol- acil-transferază (ACAT)*, rezultînd esterii lui cu diverși acizi celulari, în principal acid palmitic, palmitoleic, oleic (preponderent, cu o singură legătură dublă). Esterii colesterolului reprezintă forma de stocare a excesului său.

În aceste celule care utilizează activ colesterolul din β-LP, conținutul lui se reglează pe două căi:

1) Colesterolul eliberat reține sinteza reductazei, frînînd și sinteza lui *de novo*. Însuși receptorul la LP se reglează prin retroinhibiție (2). În fibroblaști perioada de înjumătățire durează 24 ore. Receptorii noi la un surplus de colesterol nu se sintetizează și, în așa mod, se blochează transferul colesterolului din LP plasmei. Colesterolul în organism e excretat prin celulele ficatului, fiind secretat de bilă; în ficat se formează și acizii biliari. O parte din acizii biliari sunt eliminați prin masele fecale, alta este absorbită. În 24 ore organismul pierde aproximativ 0,6 - 1,0 g colesterol. Un rol esențial la formarea colesterolului esterificat în plasmă îl joacă *lecitin-colesterol-acil-transferaza (LCAT)*. Substratul principal este fosfatidilcholina și colesterolul liber.


Fosfatidilcholina + Colesterol ⟶ Lizolecitina + Linoleil - colesterol

Un rol aparte îl are și *lipoproteinlipaza* – enzimă tisulară ce purifică plasma de chilomicroni și pre-β-lipoproteine. Perioada lor de înjumătățire durează 6-12 ore; la β – 3-4 zile ultimele se sintetizează din primele și sunt saturate de colesterol.

α-lipoproteinele (HDL), sintetizate și secretate de ficat, se pot forma în parte ca rezultat al metabolizării chilomicronilor intestinali (fig.5.26).

Sub influența LCAT, ei capătă o formă specifică înnobilată de esteri ai colesterolului. Perioada de înjumătățire a lor e de 4-6 zile. Acidul nicotinic sporește nivelul lor și timpul de înjumătățire. Este stabilită o relație reciprocă între pre-β și α-LP. O funcție auxiliară, dar importantă, e transportul colesterolului din țesuturi în ficat, efectuat de aceste HDL. Nivelul înalt de α-LP favorizează eliminarea colesterolului din țesuturi, artere și, în final, conferă un efect de protejare în evoluția aterosclerozei.

În condiții fiziologice, mari cantități de esteri ai colesterolului se acumulează în unele glande endocrine, unde servesc ca precursori ai hormonilor steroizi.

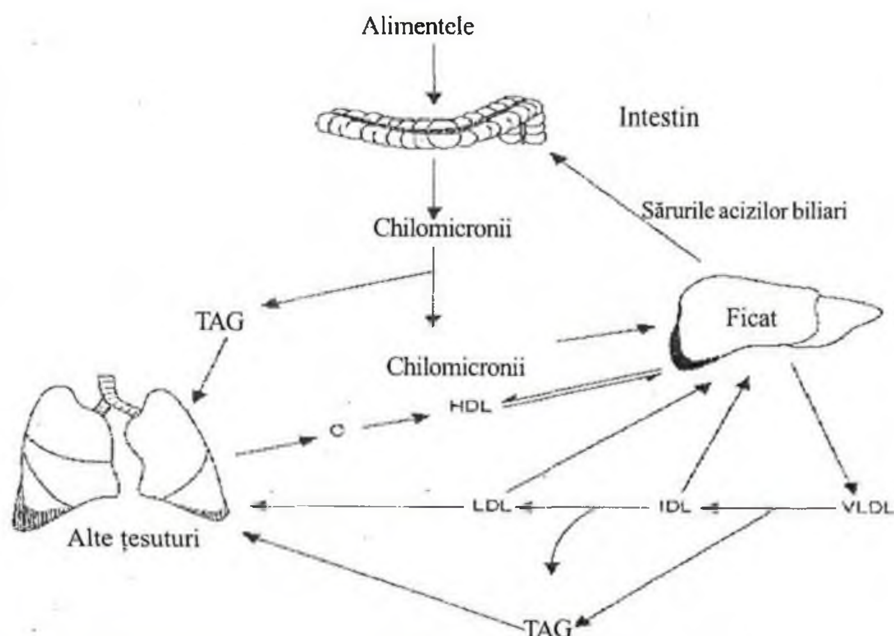


Figura 5.26. ***Metabolismul și transportul lipoproteinelor***

Colesterolul liber se acumulează și în calculii biliari – cota lui e de pînă la 60-80% din întreaga masă. Procesul depinde de staza bilei și de procesele inflamatorii din vezica biliară, ce duc la micșorarea solubilității lui. Solubilitatea colesterolului în bila care conține micele e dependentă de sărurile acizilor biliari și ai fosfolipidelor.

Deficitul ereditar al *colesterol-7 α-hidroxilazei* impedică sinteza acizilor biliari și determină creșterea concentrației de colesterol liber în componența bilei, ce va avea în consecință apariția precoce a litiazei biliare.

Ateroscleroza e o afecțiune de acumulare a steroizilor în arterele mari, a colesterolului, mai ales a esterilor colesterolului în celulă, după care și extracelular; depozitarea cauzează proliferarea celulelor (mușchiului neted) și a colagenului care, dereglînd integritatea suprafeței endoteliului, formează plăci ce provoacă tromboza și agregarea trombocitelor (fig.5.27).

Colesterolul din plăci e de natură plasmatică din β-LP (și peretele vascular, însă e puțin capabil să sintetizeze colesterolul). În condiții de *hipercolesterolemie* și ale β-LP, ultimele sunt înglobate în peretele arterial cu o viteză ce depășește viteza de eliminare a lui în plasmă și fixarea de HDL pentru transportul în ficat. Sistemul de eliminare a surplusului de colesterol este suprasolicitat. Acumularea colesterolului e secundată și de concentrația patologică mică a α-LP. E argumentat faptul că în peretele arterial apare o insuficiență relativă a *hidrolazei esterilor colesterolului*, ce contribuie la acumularea lor. Alte fracții de lipoproteine – geneza lor în ateroscleroză variază. Surplusul de pre-β comportă riscul de provocare a bolii ischemice a inimii.

Un aport alimentar crescut al colesterolului, cît și dezechilibrul între sinteză și eliminarea (sau captarea intracelulară) duce la excesul sanguin. Colesterolul se poate depune în

țesuturi, formînd depozite xantomatoase, localizate primordial periorbital sau tendonal.

Deficitul de *7-dehidrocolesterol reductază* cauzează imposibilitatea sintezei colesterolului (sindromul *Smith-Lemli-Opitz*). Nivelul seric este scăzut și maladia se caracterizează printr-un sindrom plurimalformativ, afectînd primordial sistemul nervos.

Deficitul ereditar al *colesterol-26-hidroxilazei* cauzează *xantomatoza cerebro-tendinoasă*, afecțiune genetică, cauzată de blocarea etapei finale în biosinteza acizilor biliari și acumularea excesului de colesterol în țesuturi (xantoame tendinoase). Clinic, se depistează dereglări neuromotorice, cu apariția precoce a neuropatiei periferice. Tratamentul constă în utilizarea inhibitorilor HMG-CoA-reductazei. Administrarea sărurilor biliare inhibă biosinteza colesterolului și completează lipsa acestora la nivelul intestinului.

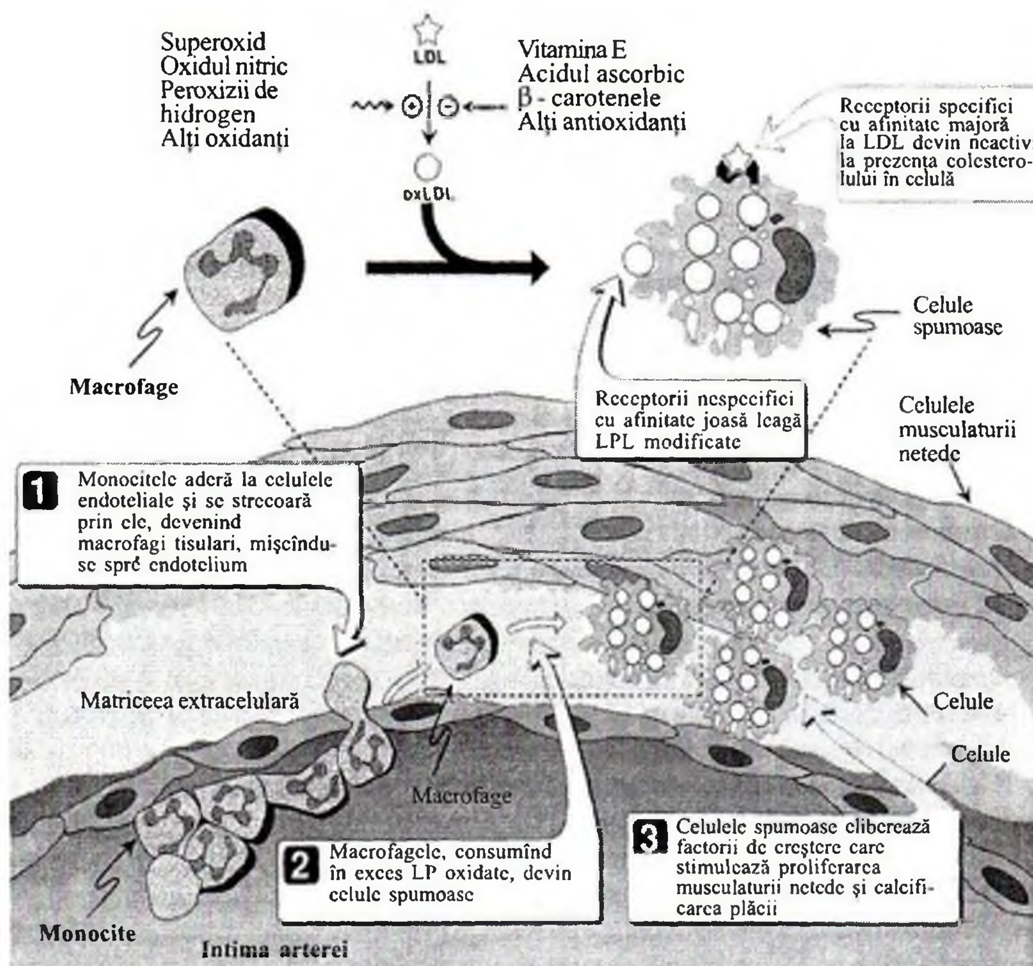


Figura 5.27. ***Rolul oxidării lipoproteinei în plăcile arteriale***

PATOLOGIA LIPIDELOR

E concludentă o maladie rară, *afecţiunea Tangier,* cauzată de insuficienţa sau lipsa totală de α-LP (HDL) în sînge şi acumularea în ţesuturi a esterilor colesterolului. Sunt descrise peste 30 de cazuri, în care predomină absorbţia intensivă a chilomicronilor saturaţi de esterii colesterolului, de macrofagele reticulului endotelial. Afecţiunea este incurabilă.

Deficitul de sinteză sau anomaliile apo A1 cauzează reducerea captării colesterolului şi deficitul esterificării lui sub acţiunea LCAT. În afecţiunile respective se observă un risc crescut pentru ateroscleroza coronariană.

Mai frecvent se întîlneşte *hipo*-sau a *β-lipoproteinemia,* adică nu are loc sinteza LDL şi a chilomicronilor de la naştere şi, în consecinţă, este statornică steatoreea, adică nu se absorb lipidele şi vitaminele corespunzătoare. Plasma conţine puţin colesterol, TAG, ceea ce, în consecinţă, provoacă dereglări în sistemul nervos, aparatul vizual.

Insuficienţa enzimei LCAT cauzează creşterea nivelului de colesterol, ateroscleroza infantilă. Deficitul ereditar are, în consecinţă, imposibilitatea esterificării colesteroluli. Lipoproteinele au o structură modificată şi transportul colesterolului prin intermediul HPL este diminuat. Afecţiunile se manifestă prin opacieri corneene şi dezvoltarea precoce a aterosclerozei coronariene, iar insuficienţa hidrolazei acide a esterilor colesterolului (*maladia Wolman*) duce la o afecţiune gravă, cu dereglări frecvente ale glandelor suprarenale, provocînd exitus.

Hipercolesterinemia familială tip IIa e cauzată de insuficienţa sau lipsa receptorilor activi la β-LP. Mutaţiile au loc la nivelul genei pentru receptorul LDL. Homozigoţii nu le posedă absolut, şi copiii mor de afecţiuni ale vaselor coronariene din primul an de viaţă. La heterozigoţi sunt de 2 ori mai puţini decît normal, ceea ce se soldează cu diferite forme de dereglări ale transferului β-LP în celule. Tratamentul constă în reducerea colesterolului seric, prin administrarea de inhibitori ai HMG-CoA reductazei, diminuarea aportului alimentar de colesterol şi eliminarea altor factori de risc. Hipercolesterolemia familială tip IIb e caracterizată prin majorarea colesterolului seric (peste 6,3 mmol/L) şi cu creşterea conţinutului TAG şi VLDL. Serul, spre deosebire de tip IIa, este opalescent. Deficitul genetic nu e definit. Tratamentul e cam acelaşi ca şi la tip IIa.

În condiţii normale, există un echilibru dinamic între procesele de sinteză şi scindare a lipidelor membranare, gangliozidelor. Scindarea e specifică şi are loc în lizozomi.

Predomină următoarele afecţiuni (fig.5.28):

a) *insuficienţa sfingomielinazei* (enzima ce scindează fosfocholina sfingomielinei) duce la acumularea sfingomielinelor în creier, ficat, splină – insuficienţă mintală – *boala Niemann-Pick*, afecţiune genetică la care bolnavii decedează în vîrstă fragedă;

b) *lipsa β-N-acetilhexozoaminidazei* (nu are loc scindarea restului terminal al gangliozidului – N-acetilgalactozamin) provoacă *afecţiunea Tay-Sachs.* Suferă mai ales evreii americani (1:30), cealaltă populaţie mai rar (1:300). Se caracterizează prin tumefierea celulelor ganglionare ale scoarţei creierului şi ale altor porţiuni nervoase. Pe retina ochiului apar pete de culoare roşie-vişinie – gangliozid GM_2. Poate fi diagnosticată chiar la starea embrionară – se colectează lichid amniotic şi se determină activitatea enzimei corespunzătoare;

c) *boala Krabbe* constă în deficitul de galactocerebrozidază şi se manifestă prin demielinizări răspîndite la nivelul creierului;

d) *afecţiunea Gaucher* – deficit de hidrolază, ce detaşează glucoza din glicocerebrozide. Sunt deteriorate splina, ficatul, rinichii, intestinul, atestîndu-se afecţiuni hematologice evidente;

e) *leucodistrofia metacromatică* e provocată de deficitul de sulfatidază; se acumulează sulfatidele în substanţa albă nervoasă, ficat. În consecinţă, apar dereglări

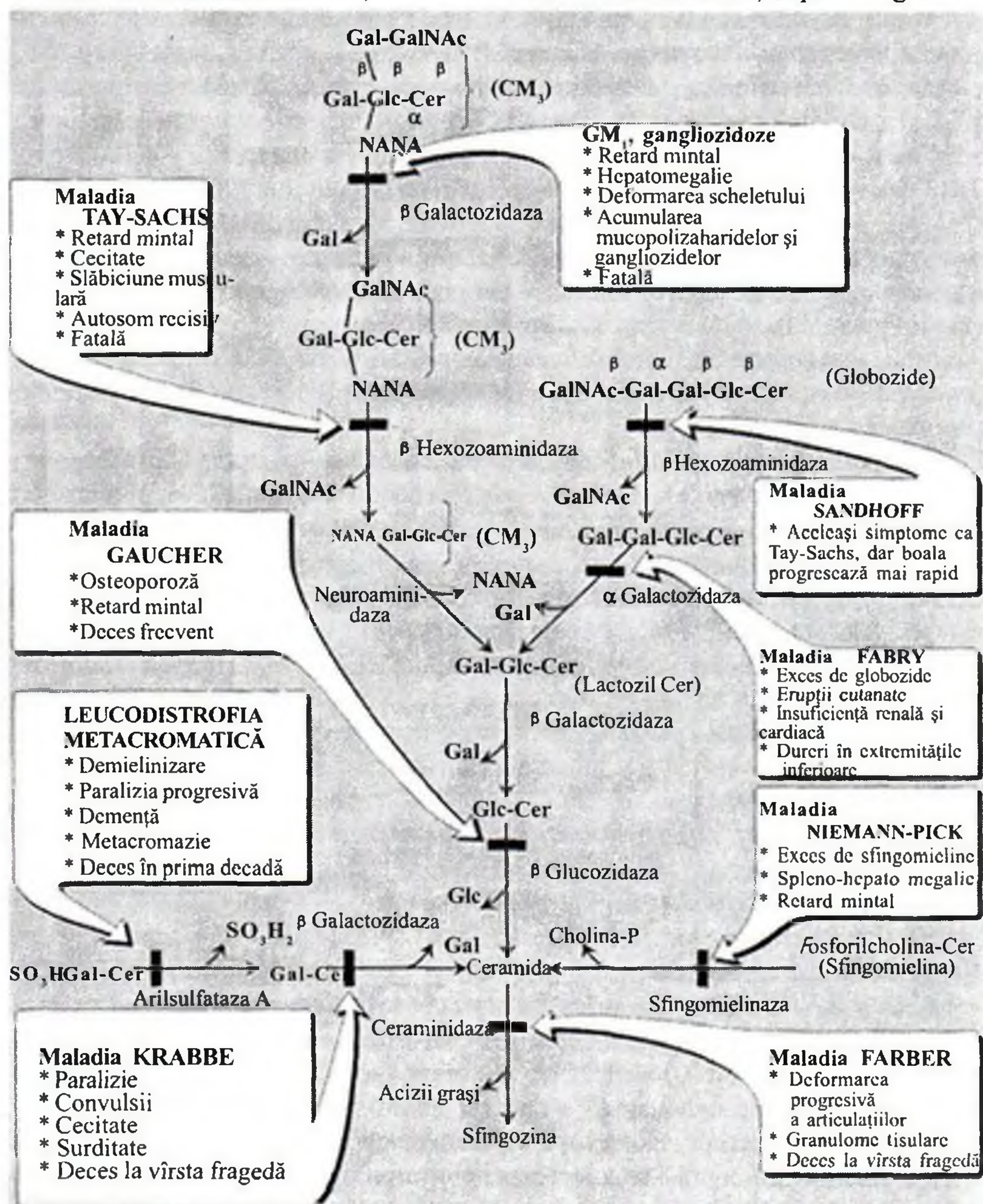


Figura 5.28. *Patologia lipidelor conjugate*

hematologice, psihice;

f) *boala Farber* – deficit de ceramidază, ce conduce la neuropatie, cataracte, tromboză vasculară.

Cum poate fi substituită enzima defectată? Există două căi:

a) în cromozomii defectaţi urmează să fie înglobată gena activă a enzimei;

b) se cere de modificat enzima defectată şi introdusă în organismul bolnavului.

Studiile întreprinse în ultimii ani au stabilit modificări ale concentraţiei lipidelor totale plasmatice sau unele fracţiuni, dezechilibrarea raportului dintre diversele componente lipidice.

Hiperlipidemiile primare sunt de natură genetică, iar cele *secundare* sunt determinate de diferite afecţiuni renale, diabet, hipotireoză, intoxicaţii de alcool.

Hiperlipidemia alcoolică: se observă o lipidemie alimentară o dată cu consumul de alcool; e însoţită şi de o secreţie intensă a pre-β-LP, de o hiperchilomicronemie şi de un clirens lent al ambelor particule.

Alcoolul amplifică sinteza şi secreţia pre-β-lipoproteinelor determinate de valorile majorate ale NADH. Se formează la metabolizarea alcoolului sub acţiunea alcool dehidrogenazei. NADH inhibă oxidarea acizilor graşi şi amplifică sinteza TAG şi a pre-β-lipoproteinelor (VLDL). Alcoolul favorizează inducţia enzimelor microzomale în ficat.

Diabetul zaharat se manifestă prin diminuarea lipoproteinlipazei celulare, iar nivelul mare de acizi graşi amplifică producerea de pre-β-LP. Raţia tipică care provoacă conţinutul excesiv de grăsimi, colesterol şi cantităţi mici de glucide provoacă apariţia hiperlipidemiei.

Reglarea metabolismului lipidic

Stresul emoţional negativ, inaniţia, hipotermia, efortul muscular cauzează pierderea din greutate a organismului. Catecolaminele stimulează lipoliza prin mesagerul secund, activează lipaza hormono-dependentă. Glucagonul are o acţiune asemănătoare. La fel şi hormonul de creştere, dar cu o fază mai tardivă (stimulează sinteza adenilatciclazei *de novo*). Insulina posedă efect contrar, activează fosfodiesteraza. Steroizii, tiroxina au efecte benefice – insuficienţa lor favorizează depozitarea de grăsime.

Un şir de substanţe, medicamente poartă denumirea de *substanţe lipotrope*. Ficatul este un organ specific de sinteză a fosfolipidelor plasmei. În lipsa cholinei sau a grupelor CH_3, necesare pentru sinteza lor, diminuează viteza de sinteză a fosfolipidelor şi, respectiv, viteza cu care acizii graşi sunt eliminaţi din ficat. În consecinţă, are loc depozitarea lipidelor în ficat. Orice substanţă donatoare de CH_3 pentru sinteza cholinei este denumită lipotropă. Substanţele ce achiziţionează grupele CH_3 din sinteza cholinei sunt capabile în anumite condiţii să provoace distrofia grasă a ficatului.

Una din problemele cardinale ale medicinii, indiferent din ce prismă este privită, e cea a *obezităţii*. În sens biochimic, e vorba de majorarea cantităţii lipidelor neutre în organism. Cantitatea optimă e determinată de mai mulţi factori – de la cei genetici, pînă la cei estetici. Surplusul de grăsimi e caracteristic în special sexului frumos.

Obezitatea poate fi hipercelulară (pînă la 20 ani) şi hipertrofică – adipocitele constante la număr se măresc în volum. Obezitatea este cauzată de dereglările echilibrului

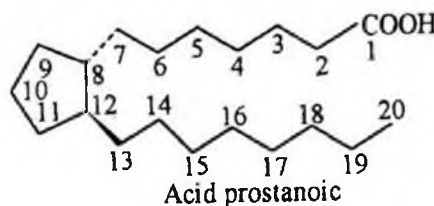
energetic, de surplusul față de necesitățile organismului. Mecanismul biochimic constă în insuficiența lipolizei, inactivarea trigliceridlipazei. E redusă și reacția de termoreglare: la utilizarea alimentelor, energia chimică nu se transformă în căldură (normal, circa 10%).

Un rol important îl are alimentarea corectă a copilului. O abundență de alimente, în primii 1-2 ani de viață, potrivit studiilor numeroase are o influență nefastă asupra dezvoltării ulterioare a organismului.Dintre factorii etiologici la acest proces contribuie: hiperinsulinismul, β endorfinele, dereglările hipotalamusului. Suferă îndeosebi femeile de vîrstă mijlocie. S-a observat corelația între nivelul intelectual și greutatea corpului, nivelul general de cultură al populației. Oamenii obezi, mai frecvent suferă de afecțiunile inimii – 40%, ale rinichilor – 30%, diabet – de 4 ori mai des decît întreaga populație.

Un tip particular de obezitate a fost descris la pacienții cu defecte în structura receptorilor β-adrenergici, care diminuează transmiterea intracelulară a efectelor hormonilor lipolitici.

EICOSANOIZII - PROSTAGLANDINELE (PG)

Sunt substanțe biologice active descoperite în 1930. Ele au produs o revoluție în știința medicală. Timp de 30 ani (1963) nu au suscitat nici un interes lumii științifice și dacă în 1960-1961 au fost publicate numai 5 studii, apoi în 1970 au văzut lumina tiparului peste 1280 de lucrări științifice. Acest an se caracterizează prin faptul că savanții au reușit să izoleze, să purifice și să analizeze, în aspect chimic, cîteva dintre prostaglandine. În prezent în lume se publică aproximativ 9-10 lucrări pe zi. S-a demonstrat că PG realizează efecte biologice de o diversitate extraordinară. În mod virtual ele se află în toate țesuturile de mamifere și fac parte din cele mai active substanțe biologice, avînd efecte semnificative la concentrații extrem de mici (10 g/mL). Rolul lor nu este elucidat complet.



Acid prostanoic

Termenul *prostaglandină* a fost sugerat de savantul U.Von Euler, în 1935, la descoperirea lor în extractele de prostată și în conținutul veziculelor seminale de berbec. Datorită concentrațiilor extrem de mici, a instabilității lor chimice, deficienței de izolare din țesuturi și tumori, a dificultății de sistematizare a efectelor lor biologice, ele au fost ignorate mai bine de trei decenii. Numai în 1960, S.Bergsfröm a reușit să izoleze din extractul de prostată de berbec PG E și F. Această posibilitate se datorează diferențelor de solvabilitate în eter și tampon fosfat. Prostaglandinele E – (PGE) sunt solubile în eter, iar cele F – în tampon fosfat. Au fost identificați drept acizi grași analogi ai unui acid gras cu 20 atomi de carbon, căruia, prin analogie cu denumirea de prostaglandine, i s-a dat denumirea de *acid prostanoic*.

Structura chimică a PG

Toate derivă din acidul prostanoic și sunt AG nesaturați cu 20 atomi de carbon, dispuși într-un inel ciclopentanic cu două lanțuri laterale: unul carboxilic și celălalt alchilic. Diversele molecule de PG se deosebesc între ele prin numărul și tipul funcțiilor

oxigen şi prin numărul de duble legături atît în lanţurile laterale, cît şi în inelul ciclopentanic şi în izomeria α/β.

Au fost izolate cel puţin 15 PG, care au fost repartizate în serii, subserii şi desemnate cu literele E,A,B,F,C şi D. La cele primare s-au adăugat şi cele PG, produse din sinteză chimică (fig.5.29).

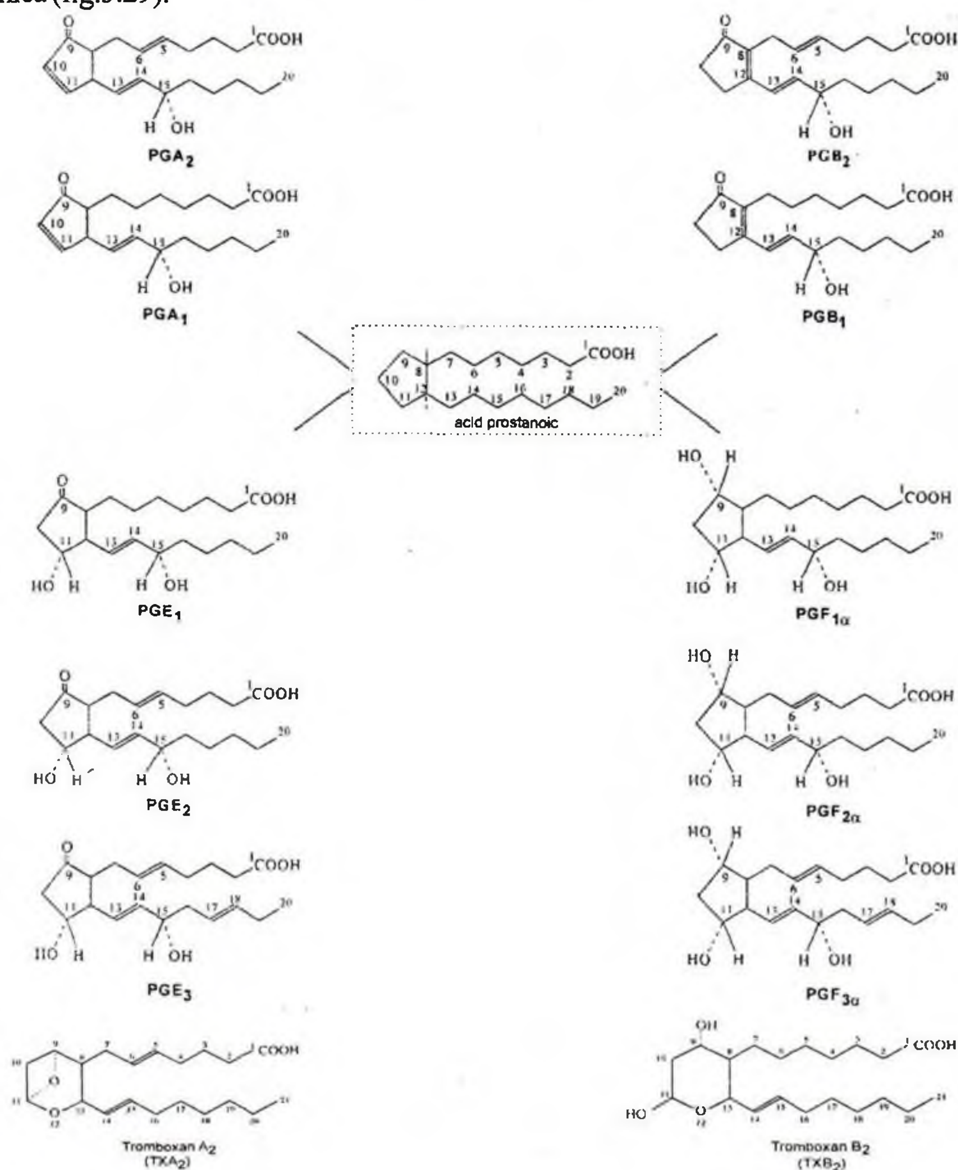


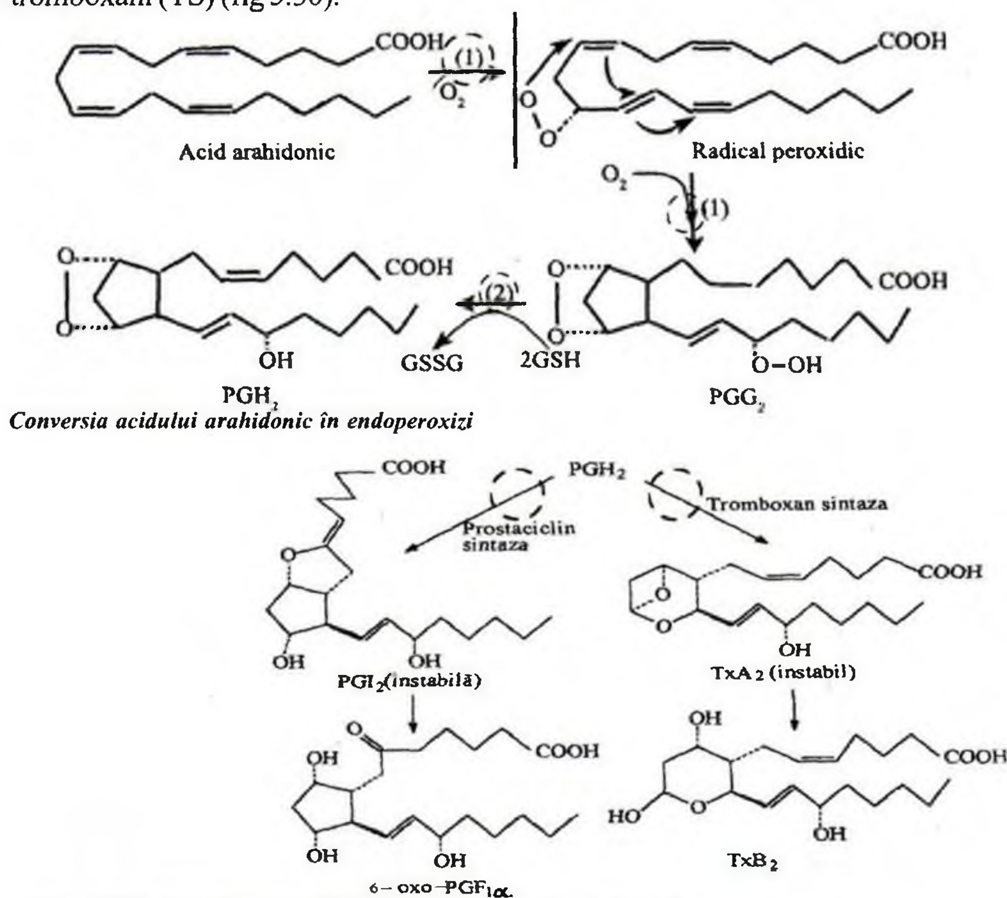
Figura 5.29. ***Cele mai răspîndite prostaglandine şi tromboxane***

Toate PG sunt hidroxilate în poziţia C_{15} şi conţin o dublă legătură trans la C_{13}-C_{14}. De la acizii graşi C_{20} derivă şi alte lipide active ca: endoperoxizii prostaglandinici, prostaciclina, tromboxanii (TX), leucotrienele (LT) – toate denumite "eicosanoizi", de la $C_{20}H_{42}$ – eicosan.

Biosinteza eicosanoizilor (EIC)

Are loc la nivelul tuturor țesuturilor, unde fiecare tip de celulă este apt să sintetizeze una sau mai multe substanțe. EIC nu sunt depozitați în celulă, după sinteză sunt eliberați și acționează imediat. Ca factori declanșatori, există o mare diversitate de stimulenți ce ajung la nivelul membranelor celulare, unde are loc o modificare a stării fosfolipidelor membranare prin activarea FL A_2, care atacă hidrolitic legătura esterică din poziția 2 a glicerolfosfolipidelor, eliberînd, de regulă, acidul arahidonic. De la el pornesc două căi biosintetice – sub acțiunea ciclooxigenazei (PG - sintază) sau a lipooxigenazei. Cantitatea, seria și subseria de PG sintizate de diverse celule, depind de: 1) natura substratului disponibil (acid eicosa-tri, tetra sau pentaenoic); 2) echipamentul enzimatic celular, balanța dintre ciclo- și lipooxigenază, prezența altor enzime specifice, unor ramificații; 3) prezența de inhibitori specifici ai uneia dintre căi; 4) natura semnalului - stimulentului (traumă, ischemie, catecolamie).

Ciclooxigenaza este o hemoproteină, cu o activitate dublă, dioxigenazică (încorporează O_2 în substrat) și peroxidazică (descompune peroxidul). Sub acțiunea ei se obțin endoperoxizii ciclici (PGG_2 și PGH_2) – compuși labili cu o T1/2 = 5', substanțe vasoactive puternice. Ei generează trei căi de sinteză spre PG clasice, prostaciclină (PS) și tromboxani (TS) (fig 5.30).



Conversia acidului arahidonic în endoperoxizi

Figura 5.30. *Transformarea PGH_2 în prostacicline și tromboxani*

Profilul enzimatic specific fiecărui țesut determină proveniența uneia sau alteia dintre aceste căi. TS se acumulează în creier, inimă, splină, fibroblaști de pulmon, leucocite, plachete. *Prostaciclinele* predomină în endoteliul vascular, inimă și în alte țesuturi, iar prostaglandinele clasice sau sintetizate, în numeroase țesuturi.

Lipooxigenaza introduce o grupare peroxi în acidul arahidonic, rezultînd 5-hidroxiperoxi-eicozatetraenoat (5-HPETE), compus instabil cu formarea leucotrienelor (trei legături duble conjugate, cu configurația cis) (fig. 5.31).

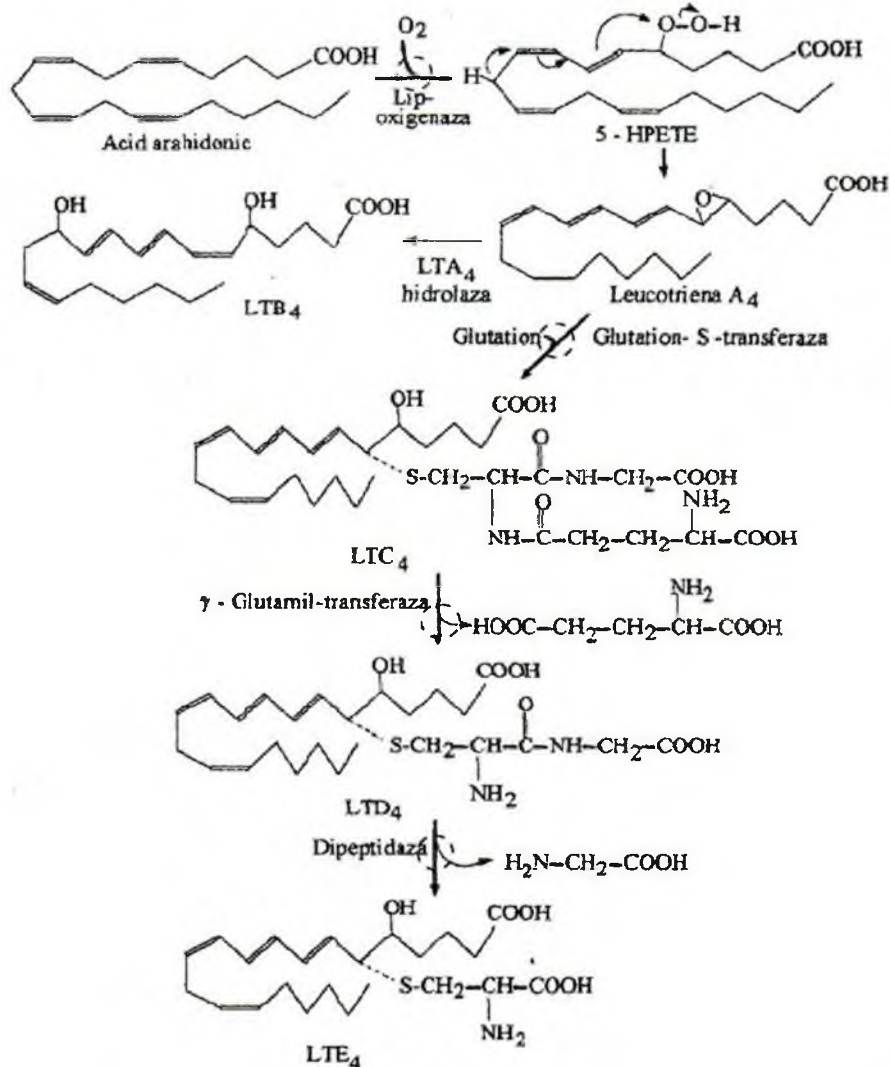
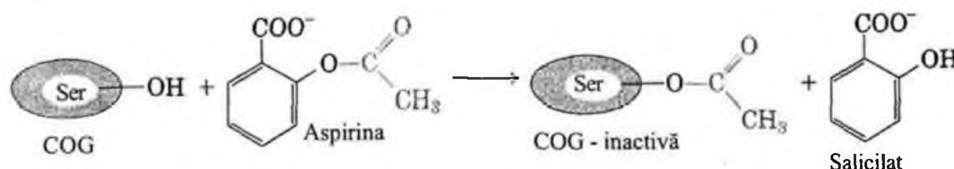


Figura 5.31. *Conversia 5-HPETE în leucotriene*

Cascada de sinteză poate fi întreruptă la diverse niveluri, prin acțiunea unor inhibitori: *corticosteroizii* inhibă fosfolipaza A_2 – întrerupe cascada de reacții la etapa inițială, prin inducția sintezei de proteine (nu are loc generarea ac.arahidonic din fosfolipidele membranare); plachetele sanguine nu sunt influențate de corticosteroizi (n-au echipa-

ment de sinteză proteică).

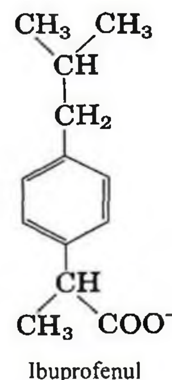
Aspirina reține ciclooxigenaza, prin acetilarea ireversibilă a proteinei; plachetele devin mai sensibile. Agenții antiinflamatori nesteroidici – indometacina, ibuprofenul şi alții, acționează fie prin inhibiție competitivă cu acidul arahidonic, fie prin modificări conformaționale ale ciclooxigenazei (COG):



Catabolismul – T 1/2 pentru tromboxani durează pînă la 30 minute, prostaciclina – 3 minute.

Prostaglandinele primare sunt eliminate rapid la nivelul pulmonului (la o singură trecere plămînul reține 95%).

Principalul metabolit al PG sunt derivații 15-ceto rezultați din acțiunea PG-15-hidrooxi-dehidrogenază, precedată de activitatea unei reductaze-9-ceto PG reductază. Prostaciclina e metabolizată la 6-ceto. Enzimele biosintezei necesită glutation redus şi acid tetrahidrofolic.



Ibuprofenul

Efectul biologic e multiplu şi depinde nu numai de natura compusului, dar şi de tipul celular, de specie. PG sunt mesageri chimici locali, modificînd concentrația nucleotidelor ciclice, nivelul intracelular al ionilor Ca^{++} sau transcrierea genetică.

PG primare se formează în cantități considerabile la nivelul tractului gastrointestinal, influențînd asupra motilității, secreției şi absorbției la nivelul diferitelor segmente. Prostaglandinele seriei A stimulează expresia unor gene în stres, blochează ciclul celular la G_2/M, induc apoptoza în celulele tumorale, inhibă replicarea viruților. Cele din seria B (B_2) primar sunt depistate în osteoblaşti şi induc hipertensia pulmonară. Seria E are efect antiulcerogen. Prostaglandinele E şi F se implică în mod deosebit în fiziologia pulmonului, reglează fluxul renal sanguin, excreția de sodiu, homeostazia apei, transmisia sinaptică în SNC, determină modificările la nivelul nucleotidelor ciclice, în cadrul sistemului reproducător declanşează travaliul, avortul, controlează ciclul ovarian, spermatogeneza şi fertilitatea la bărbați.

Prostaciclina şi *tromboxanul* constituie un sistem de control al homeostazei tonusului vaselor sanguine şi al agregării plachetare. TX posedă proprietăți de contractibilitate, acționînd asupra musculaturii netede din vasele periferice şi arterele coronariene, favorizează agregarea şi formarea trombusului. PC are o acțiune opusă celei exercitate de TXA_2, relaxează musculatura vaselor şi este un factor antitrombinic.

Acțiunea *leucotrienelor* se manifestă ca agenți chemotactici şi chemocinetici, determinînd acumularea de neutrofile în focarul inflamator, instigatori ai producerii şocului anafilactic şi astmului bronşic.

CAPITOLUL VI. METABOLISMUL PROTEINELOR ŞI AL AMINOACIZILOR. METABOLISMUL NUCLEOTIDELOR, CROMOPROTEIDELOR

Proteinele din ţesuturile şi fluidele organismului sunt utilizate într-o măsură foarte mică pentru producerea de energie. În inaniţie, după epuizarea rezervelor de glucide şi lipide, are loc degradarea lor cu utilizarea catenelor hidrocarbonate ale aminoacizilor, ce asigură durata supravieţuirii.

Excesul de proteine alimentare serveşte direct sau indirect (biosinteza lipidelor, glucidelor) în scop energetic. Organismele vii nu sunt capabile să depoziteze proteine pentru cerinţe strict energetice.

Proteinele reprezintă substanţe nutritive deosebit de importante, ca singura sursă de azot asimilabil de către organism şi furnizatoare de aminoacizi esenţiali. Numai o alimentaţie diversificată asigură aportul în aminoacizii necesari. Alimentele de origine animala sunt bogate în proteine: în preparatele din carne procentul este ridicat (20%). Ouăle conţin aproximativ 13% proteine, dar sunt bogate în colesterol (gălbenuşul). Este mult mai redus procentul de proteină în alimentele de origine vegetală: leguminoase, pîine, cereale.

Legătura proteinelor cu constituenţii lor — aminoacizii — este indisolubilă în toate procesele vitale. Proteinele din organismele vii permanent regenerează. Pentru menţinerea constantă a proporţiei lor, viteza de sinteză şi de degradare a proteinelor trebuie egalată, ceea ce constituie o stare dinamică stabilă. Viteza de reînnoire se exprimă prin perioada de înjumătăţire. La şobolani, să zicem, proteinele musculare au o perioadă de înjumătăţire egală cu 30 zile, cele hepatice — 5-6 zile, enzimele — ore sau minute.

Raportul dintre cantitatea de azot asimilat sub formă de compuşi de azot (şi proteine) şi cea de azot excretat prin urină, în formă de amoniac şi uree, reprezintă bilanţul azotat al organismului. Bilanţul este echilibrat, dacă aportul exogen compensează pierderile; negativ ($N_{ing} < N_{ex}$) — survine la inaniţie, boli infecţioase, hemoragii, traumatisme; pozitiv ($N_{ing} > N_{ex}$) — la organismele în creştere, convalescenţă. Aceste date sunt indispensabile pentru stabilirea exigenţelor diurne de proteine în raţia alimentară.

Digestia proteinelor alimentare

Absorbţia aminoacizilor are loc numai după degradarea hidrolitică a proteidelor, datorită acţiunii combinate a enzimelor proteolitice din sucurile gastric, pancreatic şi intestinal. Cantitatea aminoacizilor liberi în alimentele naturale e minoră. Deşi toate enzimele catalizează hidroliza legăturilor peptidice, ele diferă specific. Se disting exopeptidaze şi endopeptidaze (ce scindează legăturile peptidice, formate de aminoacizi la extremităţile şi în interiorul lanţului).

Majoritatea enzimelor sunt secretate în forme inactive (proenzime, zimogeni) şi sunt active doar într-un anumit segment. Anume astfel se produce protejarea celulelor reproductive şi a canalelor prin care acestea sunt secretate. Activarea lor are loc prin detaşarea unor oligopeptide, cu formarea centrului activ.

Digestia în stomac. Enzimele proteolitice digestive principale secretate de celulele stomacului sunt: pepsina, gastrixina, renina.

Pepsina este sintetizată şi secretată de către celulele principale ale mucoasei gastrice

în forma sa inactivă — *pepsinogenul*. În mediul acid al sucului gastric, pepsinogenul este activat atît prin proteoliza limitată, cît şi autocatalitic, de către pepsină.

Autoactivarea constă în detaşarea de la capătul N-terminal a 42 resturi de aminoacizi sub forma unei combinaţii de peptide, ce acţionează ca inhibitori. 12 dintre ei (acizi bazici), eliberîndu-se, micşorează pH-ul de la 3,7 (pentru pepsinogen) — la 1,0 (pentru pepsină). În centrul activ al pepsinei se află cele 2 grupe COOH ale resturilor de acid aspartic. Mecanismul de reglare a activităţii pepsinei e redat în fig. 6.1.

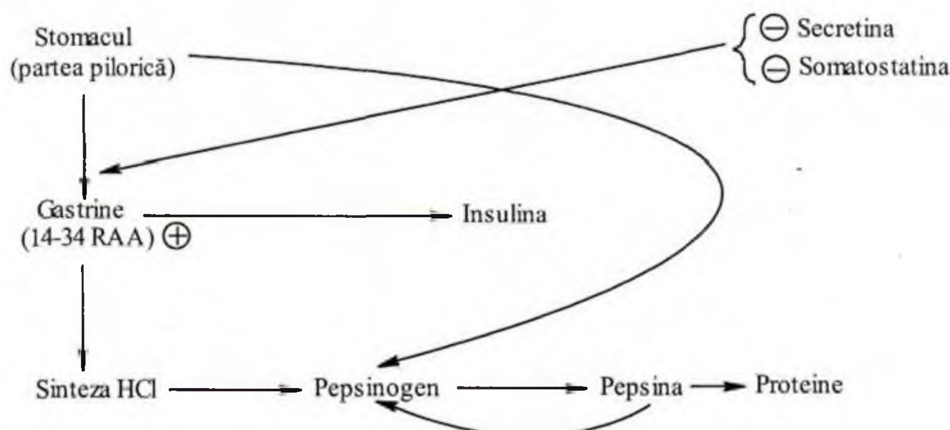
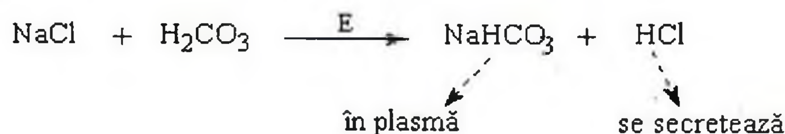


Figura 6.1. ***Mecanismul de activare a pepsinei***

În calitate de substrat pentru pepsină servesc proteinele native alimentare sau denaturate la fierbere. Endopeptidaza-pepsina atacă specific legăturile peptidice la care participă, prin grupele aminice, aminoacizii aromatici. În măsură mai mică sunt disponibile pentru atare proces metionina, leucina şi acizii dicarboxilici. Se consideră că pepsina produce un efect mai pronunţat asupra proteinelor denaturate, ce conţin SH grupe libere. Durata limitată de stare a bolului alimentar în stomac duce la formarea amestecului de polipeptide.

Gastrixina (pepsina C) şi *renina* (chimozina) sunt enzime aflate în sucul gastric al sugacilor. Secvenţa aminoacidică le conferă o omologie perfectă şi activează la un pH egal cu 3. Renina, în prezenţa Ca^{2+}, transformă *cazeina* laptelui în *paracazeină*, hidrolizată apoi de pepsină.

Celulele secundare secretează soluţiile 0,16 M HCl şi 0,007M KCl cu resturi de alţi electroliţi. Totodată, se mai secretează şi factorul intern. Concentraţia H^+ în stomac e de 10^6 mai mare decît în plasmă. Micşorarea acidităţii gastrice influenţează considerabil degradarea proteinelor (se observă la achilie, anemia pernicioasă). Sîngele venos care circulă din stomac, conţine mult HCO_3^- şi puţin Cl^- în raport cu cel arterial. În celule are loc următorul proces:



$$NaCl + H_2CO_3 \xrightarrow{E} NaHCO_3 + HCl$$

Cea mai simplă ipoteză presupune că mecanismul de secreție e analog cu transportul protonilor, dependent de ATP în cadrul funcționării ATP-azei din membrana internă mitocondrială.

În ultimii ani s-a conturat rolul H^+, K^+-ATP-azei în reglarea secreției HCl în mucoasa gastrică. E componentă din familia enzimelor, ATP-aza membranelor plasmatice, de rînd cu Na^+, K^+-ATP-aza, Ca^{++}-ATP-aza (fig. 6.2).

Enzima este intercalată în membrana apicală a celulelor epiteliale din mucoasă. În componența ei deosebim 2 subunități α cu masa moleculară ≈ 110 kDa (1103 aminoacizi), ce au funcție catalitică, și β-subunitate — un glicoproteid, partea proteică avînd o masă moleculară ≈ 35 kDa (291 aminoacizi). După glicozilare, masa moleculară devine egală cu 55 kDa. Subunitățile sunt fixate rigid una de alta. Glicoproteidul determină localizarea în membrană a enzimei, reglează și funcția de transport a enzimei.

Se observă o omologie vădită (60-70%) între subunitățile Na^+, K^+ și H^+, K^+, ATP-azelor. Sunt foarte asemănătoare și structurile secundare; în β-subunitate sunt 3 punți disulfurice ce stabilizează structura sa și a complexului integru.

H^+, K^+-ATP-aza catalizează hidroliza ATP la ADP și P_i, cuplată cu sistemul de schimb al H^+ intracelular pe K^+ extracelular. Procesul de transport al cationilor e cuplat cu procesul ciclic de fosforilare-defosforilare a Asp-385 în α subunitate și transformările ciclice în conformația moleculei $E_1 \rightarrow E_2$. Conformațiile au o afinitate diferită față de cationi și ATP. În proces este implicată și subunitatea β.

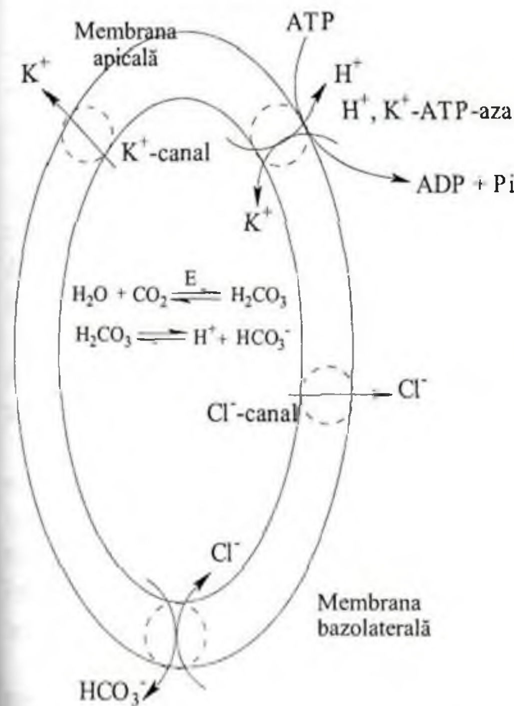


Figura 6.2. ***Sistemele de transport în celula parietală, ce determină secreția HCl***

În conformație E_1 enzima are o afinitate mare pentru ATP și H^+ în centrul de protonofixare situat pe partea citoplasmică a membranei $E_1 \rightarrow P - E_2 - P$. În conformație E_2 centrul cationofixator e acceptabil din partea spațiului extracelular cu o afinitate mică la H^+ și mare la K^+ — are loc schimbul protonului pe K^+ în centrul respectiv. Fixarea K^+ activează hidroliza P. Modificările $E_2 \rightarrow E_1$ micșorează afinitatea la K^+, ducînd la schimbul $K^+ \rightarrow H^+$, cu repetarea ciclului. E stabilit că în regiunea ce fixează ATP ia parte și Lys-517, 496. Regiunea respectivă e foarte conservativă și în alte ATP-aze de tipul P. Azi se consideră că H^+, K^+-ATP-aza de tipul P funcționează în mucoasa stomacului, intestin, rinichi.

Din celulă, K^+ iese (simultan și Cl^-), prin canale specifice după gradientul de concentrație. Cl^- pătrunde în celulă grație funcționării sistemului anionic HCO_3^-/Cl^-. HCO_3^- e rezultatul funcționării

carbanhidrazei, H^+ sunt secretăți de H^+, K^+ - ATP-aza. Poate fi implicat în mecanismul de schimb al H^+ extracelular pe Na^+ intracelular.

Mecanismul ce determină activarea secreției HCl

În celulele nesecretoare parietale H^+, K^+-ATP-aza este neactivă și-i concentrată în vezicule, în citozol, în apropierea suprafeței apicale membranare. Activarea secreției e însoțită de trecerea acestor vezicule spre suprafața apicală și contopirea cu membrana. Un rol activ îi aparține citoscheletului acestor celule. Proteinele își schimbă poziția. În celula activă, F-actina se depistează în apropierea suprafeței apicale membranare și în canalele intracelulare, iar miozina și proteinele filamentoase părăsesc aceste locuri.

În proces participă și proteinele fixatoare de GTP, ce sunt depistate în celulele parietale. Una din aceste proteine (masa moleculară 23 kDa), numită Rab-2, își modifică localizarea la activarea secreției, în același mod ca și H^+, K^+-ATP-aza, ce confirmă participarea ei în procesul contopirii veziculelor.

Secreția HCl de celule este activată de *histamină, gastrină, acetilcholină.* Toate au receptori respectivi — H_2 (histamina) și M cu toate subtipurile (3) pentru acetilcholină. Receptorul pentru gastrină se referă la tipul B — ca și la colecistokinină.

Consecutivitatea proceselor e puțin studiată. *Gastrinele* sintetizate și secretate de partea pilorică a stomacului, sunt perfect studiate, deosebit de active fiind formele sulfat ale gastrinelor.

Gastrinele potențiază efectul histaminei. Ultima e fixată de H_2 — receptori, mărind nivelul AMPc celular; în consecință, se majorează Ca^{++} intracelular, trecînd în celulă prin membrana plasmatică.

Celulele-țintă pentru proteinkinazele AMPc dependente conțin proteine membranare și citozolice. Una din ele este *Cl-canalul,* ce în final limitează secreția HCl. La activarea cu histamină are loc translocarea unor proteine din citozol în membrană, care interacționează cu H^+,K^+, -ATP-aza, trasmițînd informația la proteinele-țintă.

Incontestabil că inhibitorii carbanhidrazei (E), de altfel ca și *cianidele, iodacetatul, dinitrofenolul,* anihilează secreția. Între pereții mucoasei membranare există o disproporție de potențial. Hormonii sunt reglatori intracelulari cu efect receptoric. Gastrinele amplifică concentrația Ca^{++} intracelular, pe cînd *acetilcholina* induce eliberarea Ca^{++} și din exteriorul celulei (fig. 6.3).

Se atestă drept efectivă metoda de investigare vizavi de eventuala secreție a acidului clorhidric prin aplicarea probei cu histamină, care acționează conform mecanismului redat anterior.

Digestia în intestin. Proteoliza în intestin este asigurată de sucul pancreatic ce conține endo- și exopeptidaze în forme inactive. *Tripsinogenul* este convertit în *tripsină* prin detașarea de la capătul N-terminal al unui hexapeptid. Procesul e influențat de *enterokinaza* intestinală, cît și de autocataliză (efectul enterokinazei de 2000 de ori mai pronunțat). *Tripsina* hidrolizează legăturile peptidice, cu participarea grupelor carboxil ale aminoacizilor-arginina și lizina.

Chimotripsina se secretează în forma neactivă — *chimotripsinogenul,* drept activatori servind tripsina și autocataliticul, ce detașează două dipeptide de la lanțul compus din 245 aminoacizi, cu instituirea unei conformații active ce posedă legături

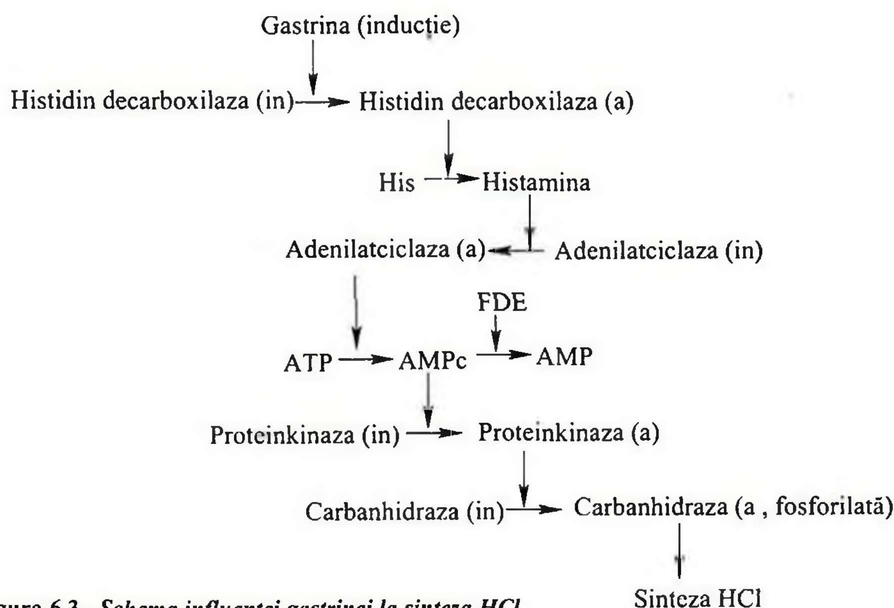


Figura 6.3. ***Schema influenței gastrinei la sinteza HCl***

disulfidice încrucişate. Enzima are o specificitate mai amplă, hidrolizează legăturile peptidice formate de grupa COOH, a Phe, Tyr, Trp. De altfel, scindează şi amidele, esterii, derivații acil.

Elastaza se obține din *proelastază*, catalizează ruperea legăturilor formate de aminoacizi hidrofobi relativ mici — glicina, alanina, serina, e activată de tripsină.

Carboxipeptidaza - A este o enzimă ce conține Zn, scindează aminoacizii aromatici mai intensiv, începînd de la capătul C-terminal, decît cei alifatici. Atunci cînd ionul de Zn se modifică la Ca, se declanşează activitatea esterazică. *Carboxipeptidaza-B* acționează asupra peptidelor, avînd la capătul C-terminal resturi de Arg şi Lys.

Definitivarea hidrolizei se soldează prin implicarea enzimelor intestinale (din intestinul subțire). Prioritar, funcționează intracelular după deplasarea în enterocite sau în procesul traversării celulelor epiteliale.

Aminopeptidazele — leucin aminopeptidaza — conține Zn, pe care o poate activa Mn; posedă o specificitate N-terminală a peptidelor. Alanin aminopeptidaza e specifică la capătul N-terminal al alaninei. *Dipeptidazele* - glicil-glicin dipeptidază. *Prolinaza* scindează legăturile peptidice, cu participarea grupei COOH a prolinei. *Prolidaza* — cu participarea grupei NH a prolinei.

Se observă că o hidroliză efectivă poate avea loc şi la rezecția stomacului, pe cînd insuficiența pancreasului are consecințe mai grave pentru organismul uman. pH-ul al sucului pancreatic (7,4-8,3) e izotonic cu plasma: concentrația de HCO_3^- depăşeşte de 3 ori concentrația similară din plasmă. *Secretina* stimulează eliminarea unui suc pancreatic sărac în enzime, prin intermediul AMPc. *Colecistokinina*, un suc bogat în enzime, stimulează contracția vezicii biliare.

Secreția colecistokininei duodenale e stimulată de lipidele şi polipeptidele din intestin.

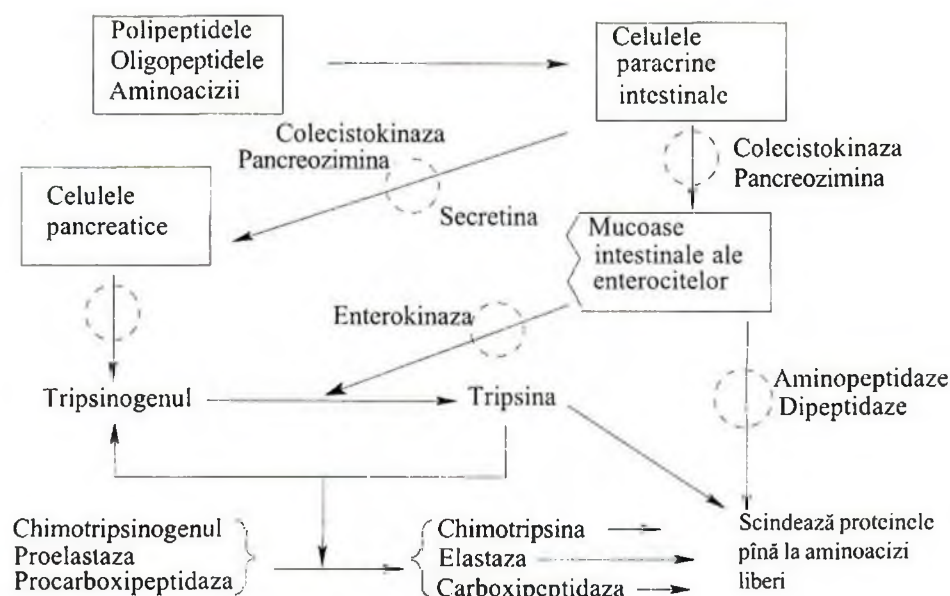


Figura 6. 4. *Mecanismele de reglare ale proteazelor*

Gastrinele sunt stimulatori ai secreției de insulină (fig. 6.4).

Absorbția aminoacizilor are loc la nivelul intestinului subțire, fiind un proces activ cu solicitări de energie, analog cu transportul glucozei şi dependent de Na^+. Sîngele portal îi transportă în ficat, unde ia parte la sinteza proteinelor proprii şi serice. Restul aminoacizilor din fond este distribuit cu sîngele celorlalte țesuturi.

Absorbția aminoacizilor prin difuzie e limitată. Transportul este mediat de proteine specializate, *translocaze*. Există cîteva translocaze de grup ce transportă aminoacizii cu o structură analoagă:

1. Aminoacizi neutri cu molecule mici;
2. Aminoacizi neutri cu molecule mari;
3. Aminoacizi bazici;
4. Aminoacizi cu caracter acid;
5. Prolina.

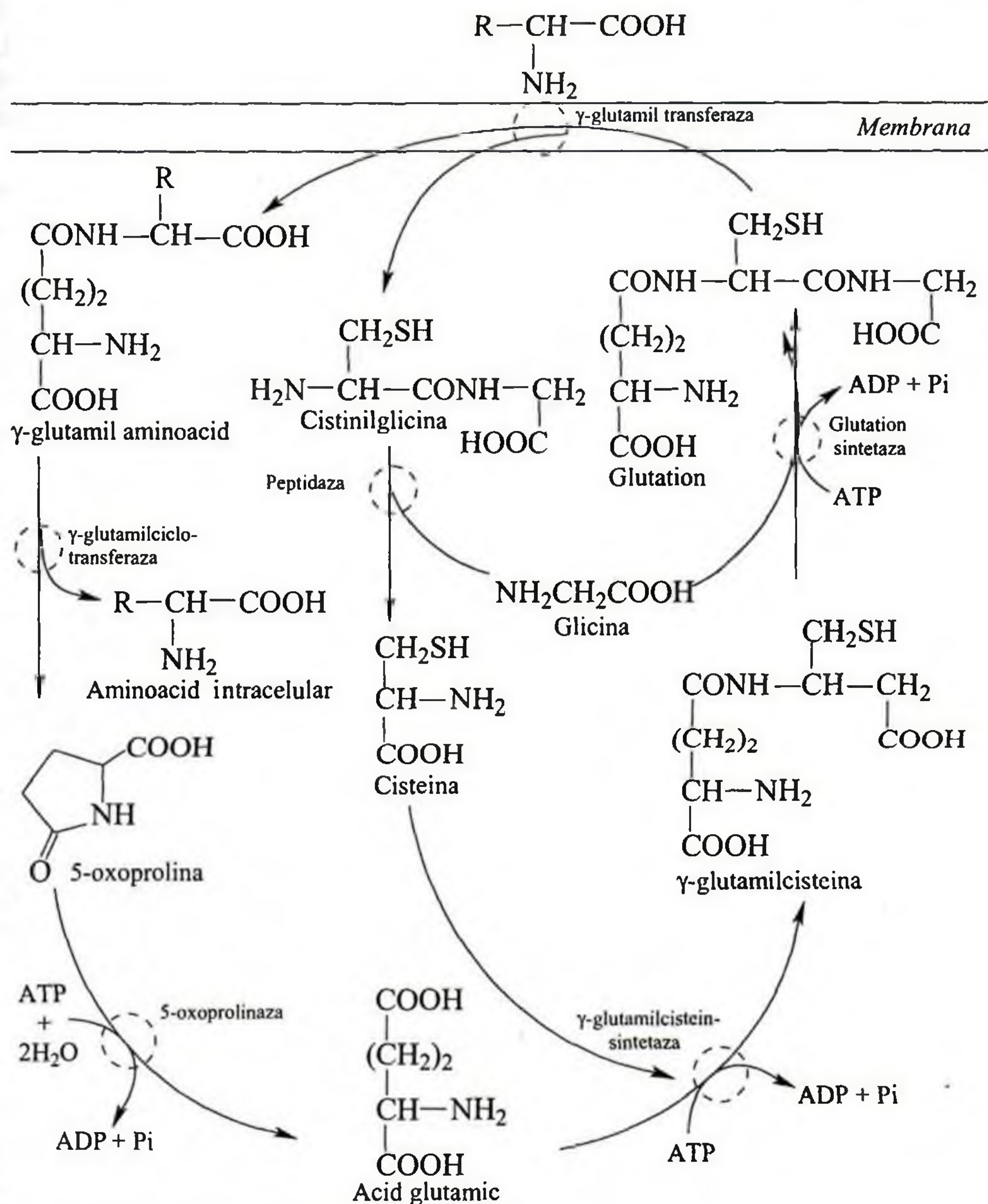
Translocazele în multe privințe seamănă cu enzimele: posedă fenomenul de saturare cu substrat, sunt sesnsibile la acțiunea unor inhibitori. Aminoacizii din grupe concurează pentru locusurile de fixare în translocaze — absorbția leucinei diminuează absorbția izoleucinei şi valinei. Lizina inhibă absorbția argininei.

După alimentare, concentrația maximă de aminoacizi în sînge ajunge la 60 min.— creşte intensiv abundența azotului peptid în sînge. Deseori, proteinele native, prin mucoasa intestinală, trec în sînge. Nou-născuții conțin în sînge anticorpii colastrei laptelui, fapt cauzat de o proteină — inhibitor puternic al tripsinei, favorizat de concentrația mică a enzimelor proteolitice în intestinul copiilor, ce în final determină absorbția unor cantități mici de proteine. Şi, deci, sunt suficiente pentru sensibilizarea organismului — cauza idiosincraziei la proteinele alimentare (ou, lapte). Vag rămîne transportul peptidelor în sînge la holeră, botulism, difterie etc.

Transportul aminoacizilor în celule este asigurat de funcționarea *ciclului γ-glutamilic* activ în intestin, creier, rinichi, glandele salivare. În ciclu participă tripeptidul — glutation (γ-glutamilcisteinilglicina) propriu tuturor celulelor.

Rolul-cheie îl joacă enzima membranară γ-glutamiltransferaza care inițiază cataliza. În calitate de donator al grupei γ-glutamil poate servi oricare alt γ-glutamil peptid. Toți aminoacizii pot servi ca acceptori, cu excepția prolinei.

La transportul aminoacizilor, din exterior în interiorul celulei se utilizează energia



Mecanismul de transfer al aminoacizilor în celulă

hidrolizei legăturilor peptidice ale glutationului, care apoi regenerează într-o secvență de reacții consecutive. Aşadar, pentru transportul aminoacizilor în celulă e utilizată energia a trei legături macroergice de ATP. Transportul intracelular al aminoacizilor este asigurat şi de transportatori membranari specifici, funcția cărora este reglată de insulină. Majoritatea sunt sisteme de cotransport cu ioni de sodiu, utilizînd energia ATP. Sistemul A este specific pentru aminoacizii aromatici şi Ala, Ser şi Gly. Sistemul ASC intervine în transportul Ala, Ser şi Cys. Aminoacizii bazici sunt transportați de sistemul B+, iar cei cu caracter acid — de sistemul X. Sistemul N, prezent la nivelul hepatocitelor, asigură transportul Gln, Asn şi His. Independent de pompa de Na+ funcționează sistemul L, care intervine în transportul aminoacizilor ramificați. Concentrația aminoacizilor în plasmă e de 0,35-0,65 g/L. Aminoacizii sîngelui sunt momentan asimilați de țesuturi şi organe (ficat, rinichi). Alte organe le absorb mai selectiv.

Sunt descrise unele afecțiuni ereditare, caracterizate prin *malabsorbția aminoacizilor.* Transportatorii intestinali sunt similari celor localizați la nivelul tubilor renali şi deci anomaliile metabolice afectează şi reabsorbția tubulară a aminoacizilor. Afecțiunile se manifestă prin prezența în exces în urină a anumitor aminoacizi. În *maladia Fanconi* cauzată de anomaliile reabsorbției renale a aminoacizilor, fosfatului şi glucozei se depistează acidoză, semne de rahitizm şi aminoacidurie generalizată. Un *sindrom de malnutriție proteică*, manifestat prin retard de creştere, hipotonie musculară, organomegalie şi osteoporoză se instalează la eliminarea marcată a lizinei — aminoacid esențial. Cauza este afecțiunea genetică, cu deficitul transportatorului şi pentru alți 3 aminoacizi — arginina, ornitina şi cisteina.

Fondul metabolic comun al aminoacizilor. Valoarea biologică a proteinelor.

Rolul primordial al aminoacizilor constă în participarea lor la sinteza proteinelor, fiind furnizori primari ai atomului de N şi fragmentelor de hidrocarburi la formarea multiplilor compuşi de azot. Capacitatea celulelor de a efectua procesele sintetice depinde de *fondul comun de aminoacizi* balansat în necesitățile celulelor la fiecare din cei 20 de aminoacizi. Celulele nu au forme-rezervă de aminoacizi şi, deci, sinteza va fi dereglată, dacă va lipsi măcar unul din ei. La microorganisme şi plante echilibrul necesar de aminoacizi e determinat de sistemele proprii de sinteză, strict reglate în concordanță cu solicitarea lor.

Animalele, avînd alt mod de existență decît oamenii, îşi satisfac necesitățile de aminoacizi din alte surse. Celulele animale nu sunt apte să sintetizeze aproape 1/2 din aminoacizi, precum şi scheletul hidrocarburic al acestor aminoacizi. Necesitatea imperioasă de aceşti aminoacizi este o consecință a condițiilor de existență. Folosind alimente ce conțin toate vitaminele, aminoacizi, în final, celulele îşi pierd capacitatea de a sintetiza. Aceşti *aminoacizi esențiali* sunt: valina, leucina, izoleucina, lizina, metionina, treonina, fenilalanina, triptofanul. Doi dintre ei sunt semiesențiali — arginina şi histidina. În anumite perioade, organismul solicită cantități mai mari de ei, decît poate sintetiza. Cu toate că aceste fenomene asigură viața în condiții destul de dificile ale mediului, organismele şi-au format o rezistență mare. Pierderea capacității de sinteză implică şi unele carențe ce cauzează anumite afecțiuni. Utilizînd în condițiile de viață cantități diferite de aminoacizi, organismul îşi păstrează echilibrul metabolic grație mecanismului care, concomitent cu utilizarea aminoacizilor, nu-i elimină şi nici nu-i depozitează.

Fondul metabolic comun al aminoacizilor sanguini e de origine proteică alimentară, susținut de hidroliza proteinelor tisulare, precum şi de sinteza lor endogenă din compuşi de natură neproteică. În acest fond nu există distincție după origine. Fiecare țesut îşi extrage tipul şi cantitatea de aminoacizi necesari momentului potrivit (fig. 6.5).

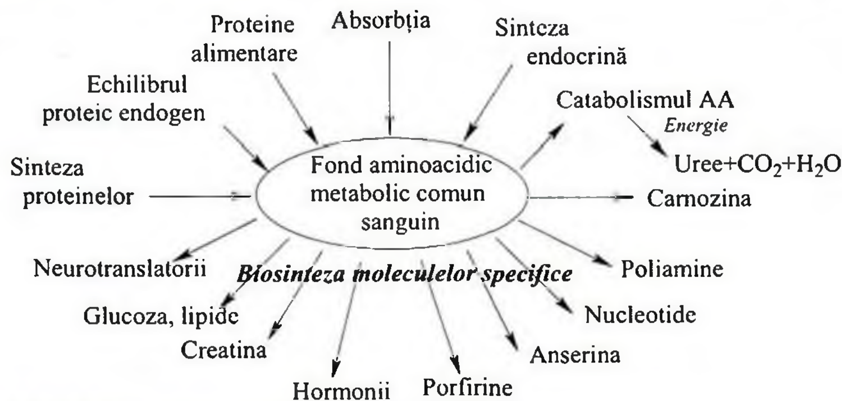


Figura 6. 5. ***Originea şi utilizarea fondului sanguin al aminoacizilor***

S-a mai constatat că în procesul evolutiv organismele animalelor pierd capacitatea de a sintetiza catene hidrocarburice pentru unii α-cetoacizi, corespondenți ai anumitor aminoacizi şi componente esențiale ale majorității proteinelor. S-a demonstrat experimental pe şobolani că este indicat un anumit raport între conținutul acestor *aminoacizi indispensabili* pentru creşterea optimă. Dacă se ia cantitatea de triptofan ca măsură relativă de referință egală cu 1, apoi pentru următorii aminoacizi ea se egalează cu: Lys = 5; Leu = 4; Val şi Phe = 3,5; Met = 3; Ile, Thr = 2,5; His = 2; Arg = 1. Aproximativ acelaşi raport dintre aminoacizii esențiali e caracteristic şi organismului uman. S-a stabilit că insuficiența unui aminoacid dereglează şi absorbția celorlalți. În cazurile date e valabilă *legitatea de minimum a lui Liebig*: *evoluția organismelor vii e determinată de acea substanță esențială, ce e absorbită din alimente în cantități mai mici.* În natură aproape că nu dăinuie proteine de valori incomplete. Iată de ce trebuie să diferențiem proteinele mai valoroase de cele mai puțin valoroase, adică de calitate inferioară. În general, *valoarea biologică a proteinelor* e apreciată după gradul lor de asimilare şi compatibilitate în organism, de relația dintre componența aminoacidică a proteinelor utilizate şi gama aminoacizilor din proteinele organismului. Zeina — proteina din porumb, de exemplu, nu conține lizină şi triptofan.

Surplusul de aminoacizi, comparativ cu suficientul necesar pentru organism (spre deosebire de acizii graşi, glucoză), nu poate fi depozitat şi nici eliminat din organism; acest surplus este consumat în calitate de combustibil metabolic. Procesul se inițiază în următoarele cazuri:

1) dacă aminoacizii eliminați la o regenerare normală a proteinelor nu se utilizează la sinteza moleculelor noi;

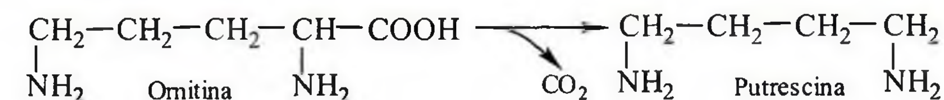
2) dacă organismul ar asimila din alimente mai mulți aminoacizi decît necesită;

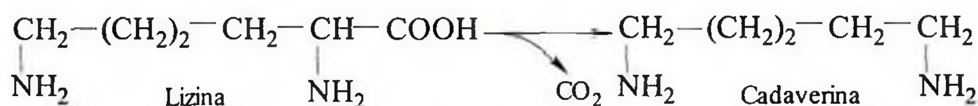
3) în inaniție sau diabet zaharat, cînd lipsesc glucidele sau e dereglată asimilarea lor.

Asimilarea aminoacizilor

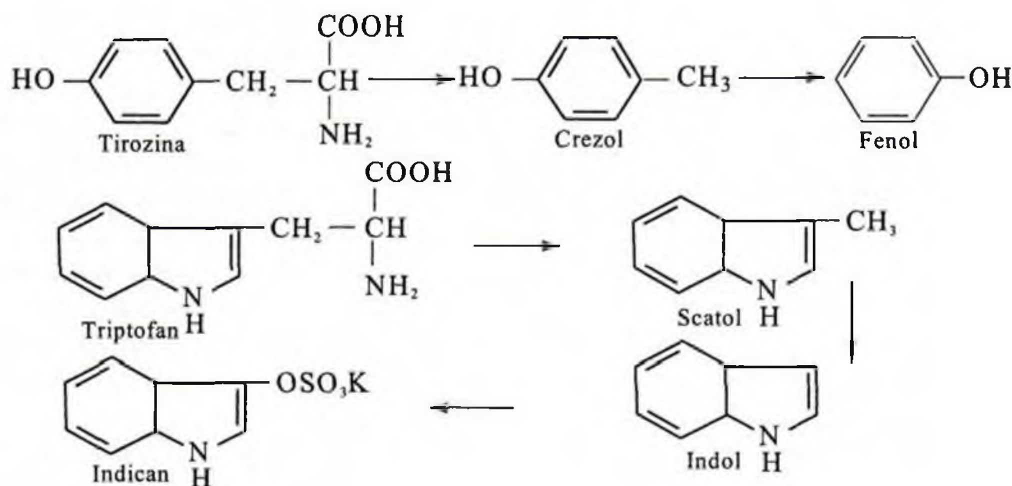
O parte din aminoacizii alimentelor este scindată de enzimele microflorei intestinale, ce catalizează reacţii deosebite de cele din ţesuturile umane.

În intestin apar, în anumite condiţii, *procese de putrefacţie*. La scindarea profundă a cisteinei, cistinei, metioninei (conţin sulf), în intestin se formează H_2S, metilmercaptanul (CH_3SH). Ornitina şi lizina (diaminoacizi) se decarboxilează, cu formarea aminelor — *putrescina* şi *cadaverina*.





La o decarboxilare bacteriană a Phe, Thr, Trp se formează aminele corespunzătoare - *feniletilamina, tiramina, triptamina.* Degradarea catenelor laterale ale aminoacizilor ciclici duc la formarea produselor toxice - tirozina (*crezol, fenol*); triptofan (*scatol, indol*). În *malabsorbţia triptofanului*, la anomaliile transportatorului respectiv intestinal indolul urinei, la contact cu aerul, îi va da o coloraţie albastră.

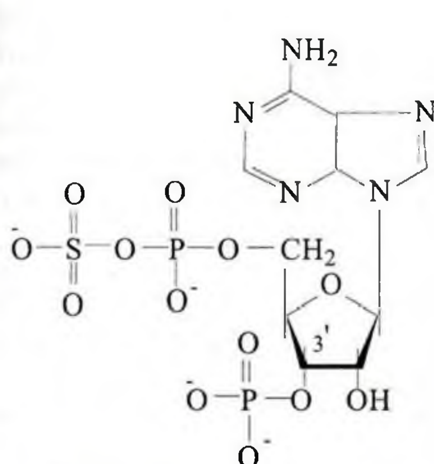


Aceste substanţe toxice se neutralizează în ficat, legîndu-se cu acidul sulfuric sau glucuronic şi formînd compuşi conjugaţi netoxici eliminaţi prin urină.

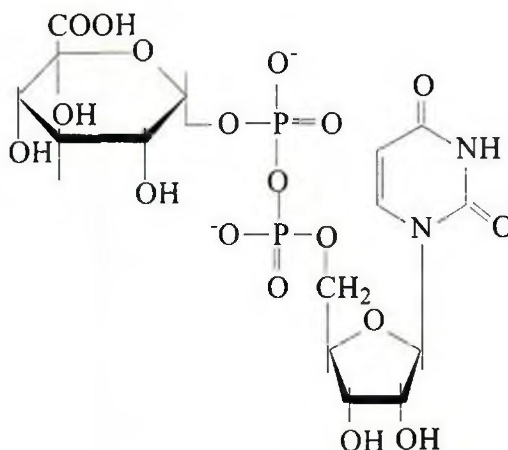
a) PAPS + Scatoxil $\xrightarrow{\text{Sulfokinaza}}$ Scatoxilsuflat + PAP (acid 3'-fosfoadenilic)

b) UDP-glucuronat + Scatoxil $\xrightarrow{\text{Transferaza}}$ Scatoxilglucuronat + UDP

Mecanismul constă în următoarele: ficatul conţine enzime specifice—*arilsulfo-*



PAPS (3-fosfoadenozin-5-fosfosulfat)

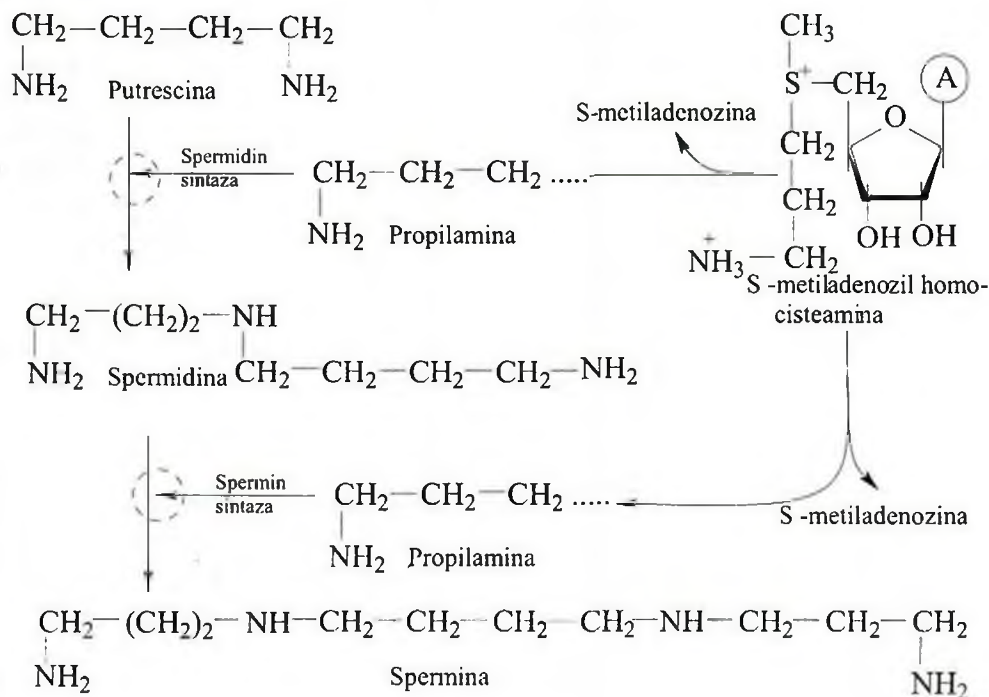


Uridildifosfoglucuronat

transferaza şi *UDP-glucuronil transferaza* —,ce transferă resturile de acid corespunzător in formele active la substanţele toxice adiacente, fiind oxidate în prealabil în indoxil, scatoxil.

Cantitatea de *indican* din urină indică gradul de putrefacţie în intestin şi starea funcţională a ficatului.

Prezenţa în ţesuturile animale a *adenozil-metionin decarboxilazei* duce la formarea *S-metiladenozil homocisteaminei.* E stabilit că putrescina şi componenţa aminopropionică a S-metiladenozil homocisteaminei se utilizează în *sinteza poliaminelor* — *spermidinei* şi *sperminei:*



Fondul comun de aminoacizii echilibrat după necesitățile orgamismului este utilizat în biosinteza proteinelor. Sinteza are loc la nivelul ribozomilor prin traducerea informației genetice, vehiculate de m RNA (vezi capit.2). Sunt descrise afecțiuni generalizate ale sintezei proteinelor cauzate de malnutriție proteică (*sindromul Kwashiorkor)* sau de malnutriție protein-calorică. Aceste maladii sunt caracterizate prin: reducerea marcată a masei musculare, diminuarea concentrației proteinelor plasmatice (cauzînd edeme), hipotonie, astenie etc.

Consecințe clinice majore se depistează și în dereglările atașării lanțurilor oligozaharidice (*sindromul de hipoglicozilare*) în procesul de maturizare a glicoproteinelor. Se manifestă prin retard psihomotor și neurologic, anomalii osoase și hipotonie musculară, cu deces în primii ani de viața.

Anomaliile sintezei unei anumite proteine constituie un numar major de boli monogenetice (peste 600). La mutațiile sintezei unei proteine enzimatice, receptorului sau unui transportator, afecțiunea se încadrează în grupul erorilor înnascute de metabolism (peste 500 descrise la moment).

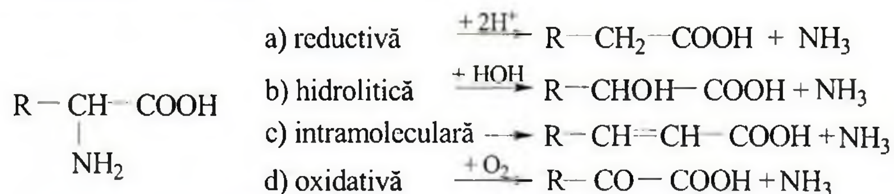
O sursă de aminoacizi ai fondului metabolic comun este proteoliza citoplasmatică sau lizozomală. Prima predomină în muschi, celalaltă — în ficat și sistemul macrofagal. Stările caracterizate prin amplificarea proteolizei (*hipercatabolice*) sunt declanșate de acțiunea hormonilor respectivi (catecolamine, cortizol, citokine), ca răspuns la situații extremale (traume, șoc, intervenții chirurgicale, arsuri, infecții etc.). Catabolismul are drept scop furnizarea energiei și a unor componente structurale celulelor imuncompetente și altor compuși, ce au ca rol susținerea funcțiilor vitale în condițiile unui aport caloric limitat și regenerarea țesuturilor lezate. *În faza acută a inflamației* crește nivelul plasmatic al complementului, fibrinogenului, proteinei C și se diminuează concentrația plasmatică a albuminei.

De rînd cu biosinteza proteinelor, există și alte căi metabolice în care sunt implicați aminoacizii. De asemenea, funcționează căi comune ale unor grupe de aminoacizi. Prin implicațiile lor multiple, o deosebită importanță au procesele de dezaminare, transaminare, decarboxilare. Decarboxilarea asigură formarea unei game largi de amine biogene. *Transaminarea* constituie o etapă-cheie în catabolismul și anabolismul aminoacizilor. Grupele - SH și - OH oferă aminoacizilor respectivi o serie de particularități metabolice.

Metabolizarea NH_2-grupelor. Dezaminarea

Se înregistrează cîteva tipuri de dezaminare. S-au izolat enzimele ce catalizează aceste reacții și s-au identificat produsele reacțiilor.

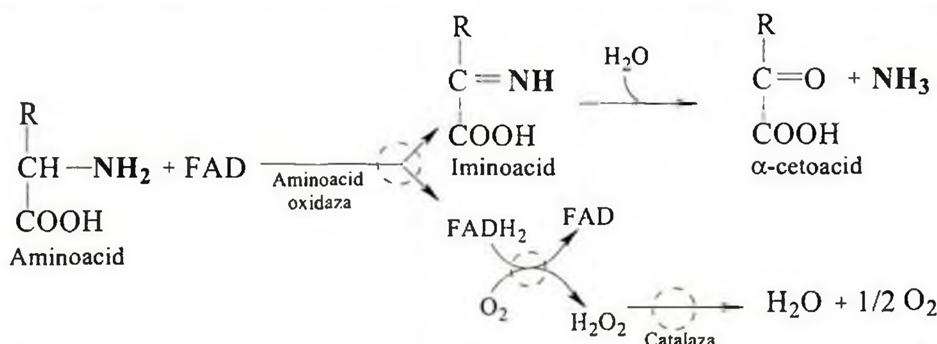
Deosebim dezaminare:



Ultima dezaminare decurge în etape: în prima etapă fermentativ are loc formarea

unui compus nestabil — *iminoacidul*, care la etapa următoare spontan, fără enzime, dar în prezența apei, degradează în NH_3 şi α-cetoacid.

Oxidazele L-aminoacizilor posedă în calitate de coenzimă FMN şi FAD, pe cînd D-aminoacid — oxidazele numai FAD. Coenzimele reduse sunt oxidate de O_2 direct, formînd apă oxigenată.

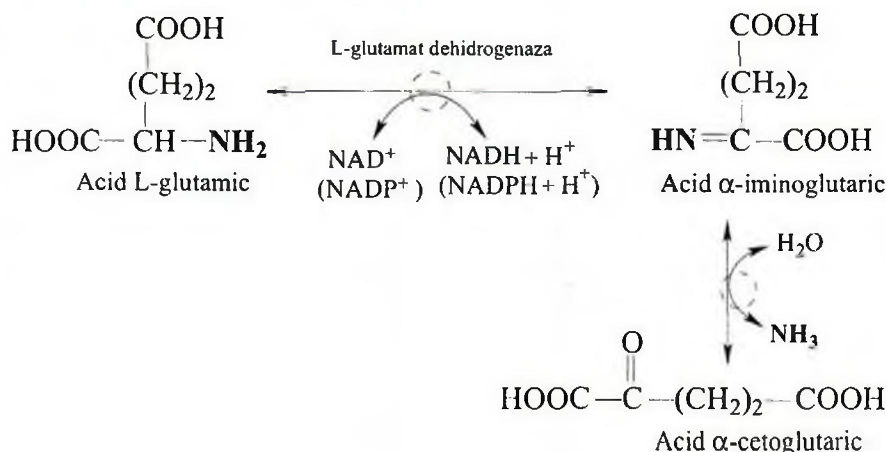


În țesuturi, la pH fiziologic e activă numai *oxidaza D*-aminoacizilor, pe cînd toți aminoacizii alimentelor sau cei din țesuturile organismului constituie L-aminoacizi. E stabilit că pH optim pentru L-oxidaze e în jur de pH = 10,0. În condiții fiziologice e activă numai L-enzima, ce catalizează dezaminarea oxidativă a L-acidului glutamic (*glutamat dehidrogenaza*), enzimă anaerobă şi răspîndită pe larg în țesuturile vii.

La mamifere, aminoacizii degradează primordial în ficat, unde grupa NH_2 este transferată pe α-cetoglutarat, cu formarea glutamatului, care, la rîndul său, e supus dezaminării oxidative, cu formarea amoniacului. Sediul acestor modificări poate fi: inima, rinichii, creierul, muşchii.

Amoniacul se formează datorită reacției de dezaminare oxidativă a acidului glutamic, reacție catalizată de *glutamat dehidrogenaza* care utilizează atît NAD^+, cît şi $NADP^+$.

Produsul intermediar este iminoglutaratul:



Activitatea enzimei se reglează alosteric. Enzima e compusă din 6 subunități identice, capabile de polimerizare continuă. Drept inhibitori alosterici servesc GTP și ATP, iar activatori — ADP și GDP. Micșorarea sarcinii energetice amplifică oxidarea aminoacizilor.

Doi aminoacizi (*serina și treonina*) pot fi *dezaminați direct* — grupa NH_2 este transformată în NH_4^+, fenomen cauzat de prezența grupei OH (fig.6.6). Reacțiile sunt catalizate de *hidrataze* (posedînd B_6 drept coenzimă).

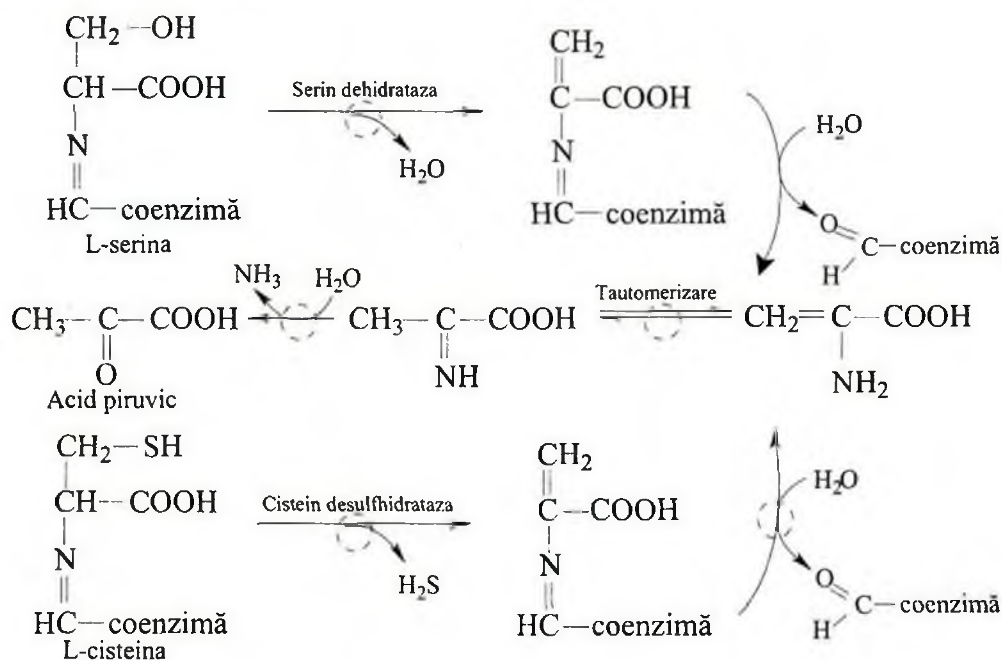
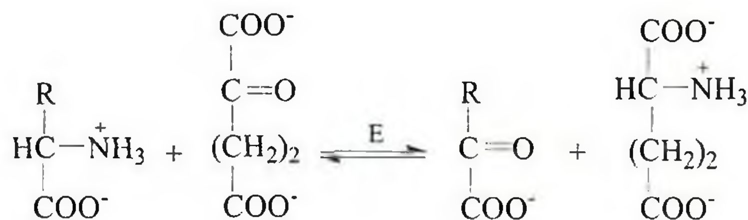


Figura 6.6. ***Reacțiile de dezaminare ale serinei și cisteinei***

Enzimele sunt denumite *dehidrataze*, deoarece în cadrul reacțiilor catalizate de ele, anterior dezaminării, are loc dehidratarea. Cea mai explorată enzimă e *treonin dehidrataza* — enzimă alosterică, inductibilă, inhibată de puromicină și glucoză. Enzima e responsabilă de gluconeogeneză, favorizată de α-cetobutiratul liber transformat în piruvat, apoi glucoză.

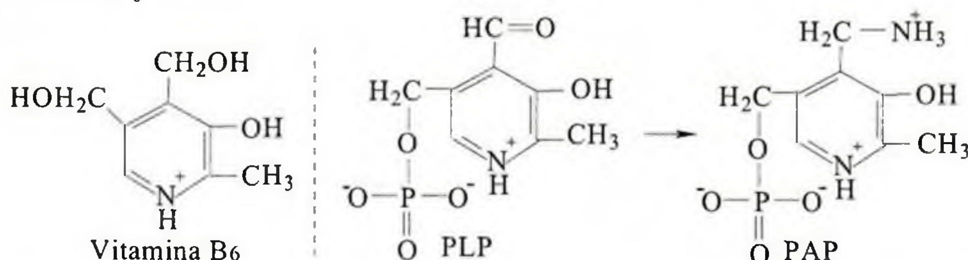
Transferul grupelor NH_2 e catalizat de *aminotransferaze* denumite și *transaminaze*. Cea mai semnificativă e *glutamat aminotransferaza*, ce deplasează NH_2 pe α-cetoglutarat:



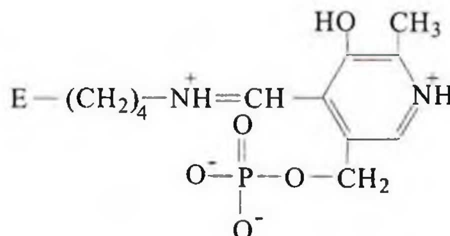
Dintre α-cetoacizi, acidul piruvic şi acidul oxaloacetic mai participă activ la transaminare.

Alanin aminotransferaza (*GPT — glutamic-piruvic transaminaza*) transferă NH_2 la piruvat, cu formarea alaninei. Ultima va ceda grupa NH_2 α-cetoglutaratului. Aceste două *alanin-* şi *aspartat aminotransferaze* (*GOT — glutamic-oxalilacetic tranaminaza — transferul NH_2 la oxaloacetat*) enzime, orientează aidoma unor pîlnii grupa NH_2 de la aminoacizi spre glutamat, pentru transformări ulterioare. E concludentă reacţia de *pereaminare* (trans), în primul rînd, pentru acidul aspartic, alanină şi acidul glutamic. Reacţia pentru ceilalţi aminoacizi este nesemnificativă. *Specificitatea* transaminazelor e determinată de compartimentul proteic. Determinarea activităţii serice a acestor două transaminaze este frecvent întîlnită în clinică şi are importanţă deosebită în diagnosticul fenomenelor de citoliză hepatică şi extrahepatică (vezi cap.Sîngele).

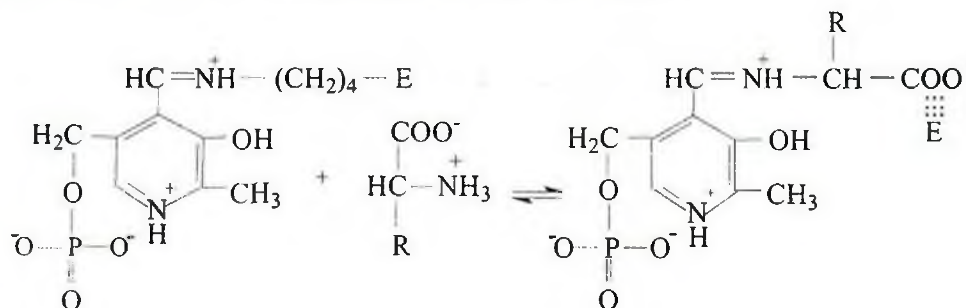
Piridoxalfosfatul (PLP) serveşte drept grupă prostetică a tuturor aminotransferazelor. În transaminare, PLP temporar se modifică în *PAP (piridoxaminofosfat)*, derivat al vitaminei B_6:



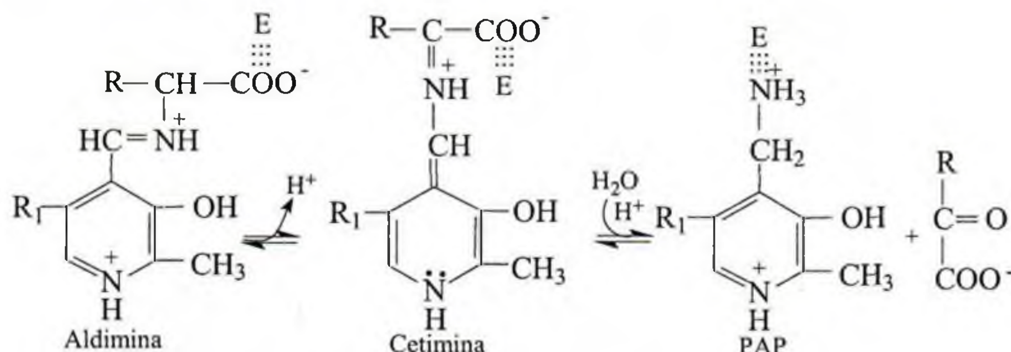
PLP e fixat de enzimă prin NH_2 a restului de lizină din centrul activ, formînd compuşi Schiff - baze:



La adiţia aminoacidului, se formează o nouă bază Schiff:

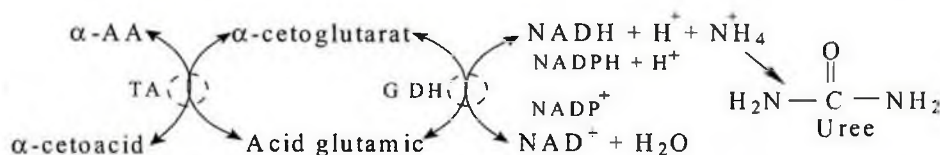


Aminoacizii sunt racordați la enzime prin legături rigide necovalente. În procesul catalizei se modifică poziția legăturii duble (aldimina ⟶ cetimina). Ultimele hidrolizează în PAP și α-cetoacid.



Lizina centrului activ favorizează transformările aldiminei în cetimină, funcționînd ca acceptor de electroni. În consecință, următorul α-cetoacid reacționează cu complexul E-PAP ⇌ E-PLP + AA_2, regenerînd complexul E-PLP.

Dezaminarea indirectă prin reacțiile de transaminare, cuplată cu dezaminarea oxidativă a acidului glutamic, se numește *transdezaminare*. Schematic poate fi redată în așa mod:



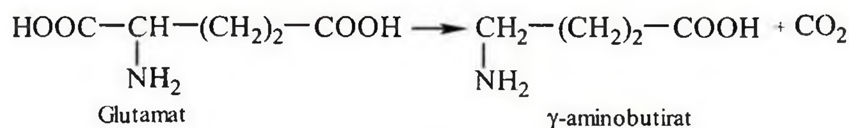
Atît transaminarea, cît și dezaminarea acidului glutamic sunt reacții reversibile. *Așadar, în organism se creează practic condiții pentru sinteza aminoacizilor, dacă conlucrează α-cetoacizii corespunzători. Acest mecanism e denumit transreaminare.*

Decarboxilarea aminoacizilor. Decarboxilarea este un proces foarte răspîndit. Enzimele, *decarboxilazele* (cu excepția decarboxilazei histidinei) utilizează în calitate de coferment piridoxalfosfatul.

Se atestă cîteva tipuri de decarboxilare:

I. *α-decarboxilare* — la decarboxilarea glutamatului în creier se produce acidul γ-aminobutiric. El se include în reacția de pereaminare cu α-cetoglutaratul, formînd semialdehida acidului succinic, ulterior oxidat în succinat, component al ciclului Krebs.

Acidul γ-aminobutiric conferă efect inhibitor în substanța cenușie a creierului. Se utilizează în clinică pentru tratarea unor afecțiuni ale sistemului nervos provocate de excitații excesive.

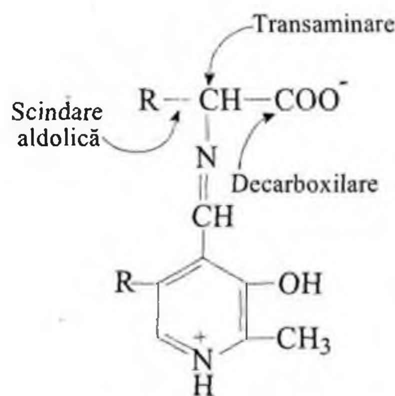


Enzimele piridoxaldependente labilizează una din cele 3 legături pe lîngă Cα a substratului aminoacidic. Aceste enzime sunt capabile să catalizeze şi alte reacții pe lîngă atomii de carbon β şi γ. Dar toate au aceleaşi particularități:

a) formează compuşi Schiff;

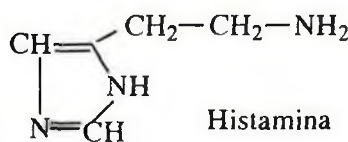
b) PLP funcționează ca acceptor de electroni, stabilizînd produsele intermediare încărcate negativ; azotul în inelul PLP atrage electronii din substratul aminic;

c) bazele Schiff formate sunt hidrolizate rapid.

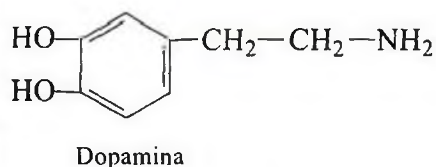


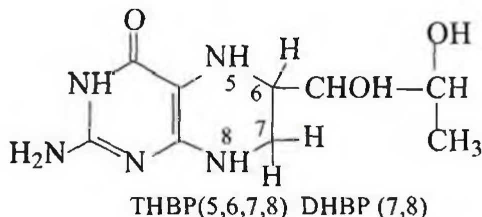
La decarboxilarea acidului aspartic şi degradarea pirimidinei se formează *β alanină* — produs ce intră în componența *carnozinei, anserinei, coenzimei A,* reprezintă un fragment al acidului pantotenic. Există liber în țesuturi şi plasmă;

Enzimele decarboxilării acizilor aromatici nu posedă specifitate înaltă de substrat. Decarboxilarea histidinei dă histamina ce reprezintă un vasodilatator puternic. *Histamina* este implicată în hipersensibilitate alergică, inflamații. O diaminoxidază îl transformă în aldehidă, o parte nedegradată în forma de derivați N-acetil sau N-CH_3 este excretată prin urină.

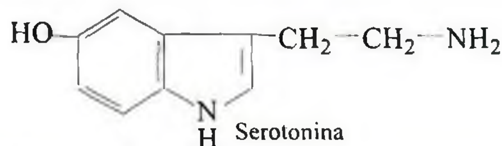

Histamina

Tirozina supusă acțiunii tirozinazei (hidroxilază) formează *DOPA*, care, fiind decarboxilată, formează *dopamina* — substanță intermediară pentru sinteza *melaninei, adrenalinei, noradrenalinei.* Tirozin monooxidaza conține drept coenzimă *tetrahidrobiopterina (THBP).*


Dopamina

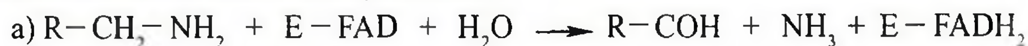

THBP(5,6,7,8) DHBP (7,8)

Triptofanul este hidroxilat de către o *monooxigenază.* Drept coenzimă serveşte THBP care, decarboxilîndu-se în creier şi rinichi, formează *serotonina.*


Serotonina

Se află în țesuturile intestinului, trombocitelor. Serotonina e mediator chimic, vasoconstrictor arterial, factor hemostatic de altfel, şi component al veninului viespilor şi al broaştelor buboase. O monoaminooxidază o scindează, formînd acidul 5-oxiindolilacetic.

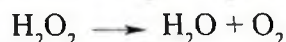
La *mecanismele de neutralizare* a aminelor biogene, care prezintă un proces fermentativ, participă *mono-* sau *diaminooxidazele*. Procesul este ireversibil, are loc o dezaminare oxidativă ce decurge în 2 etape:



$$a)\ R-CH_2-NH_2 + E-FAD + H_2O \rightarrow R-COH + NH_3 + E-FADH_2$$

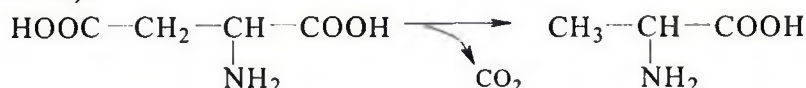


$$b)\ E-FADH_2 + O_2 \rightarrow E-FAD + H_2O_2$$

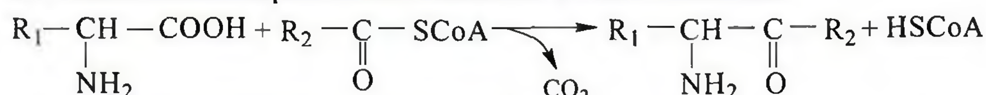


$$H_2O_2 \rightarrow H_2O + O_2$$

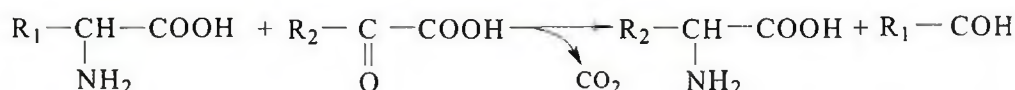
II. Pentru microorganisme e caracteristică *ω-decarboxilarea* (din aspartat se produce α-alanina):



III. Decarboxilare dependentă de *condensare a două molecule*:



IV. Decarboxilare dependentă *de transaminare*:



Soarta amoniacului

Format prin intermediul multiplelor căi metabolice, este un compus deosebit de toxic. Evolutiv, amoniacul se utilizează:

1. O parte din NH_4^+ format la degradarea aminoacizilor este reutilizată la biosinteza compuşilor azotaţi.

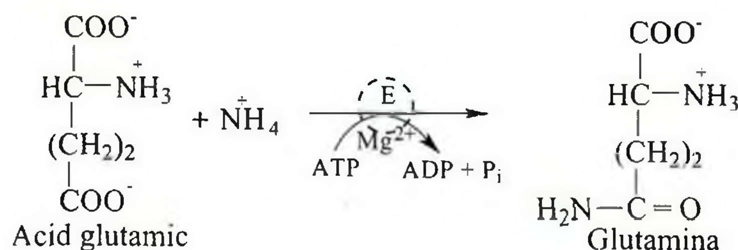
2. Surplusul de NH_4^+ la majoritatea vertebratelor este transformat în uree şi excretată din organisme.

3. Păsările şi reptilele terestre transformă NH_4^+ în acid uric pe care îl elimină.

4. Animalele acvatice îl secretă sub formă de NH_4^+.

NH_4^+ se formează în organismele animalelor, în majoritatea cazurilor, pe calea transdezaminării. Amoniacul produs în intestin (sub acţiunea florei microbiene la degradarea proteinelor) este absorbit şi transportat prin sistemul-port spre ficat.

Numai o cantitate foarte mică de NH_4^+ este dislocată în sînge în formă liberă, fapt reflectat de concentraţia plasmatică redusă: 10-20 mg la 100 mL. Cea mai mare parte este sub formă de glutamină — reacţie catalizată de *glutamin sintetază*, o enzimă localizată în toate celulele:



Transportul NH_4^+ în această formă justifică concentrația plasmatică majorată de 3-5 ori a glutaminei față de ceilalți aminoacizi. Glutamina, substanța neutră, netoxică penetrează ușor membranele celulare. În ficat și rinichi, sub influența glutaminazei, are loc hidroliza ireversibilă a glutaminei în glutamat și NH_4^+, din care se sintetizează ureea; 80-90% din conținutul total de amoniac sunt transformate în compusul vizat și eliminat prin urină.

1. *Ureea* se formează în cadrul unei secvențe ciclice de reacții tradiționale, denumite *ciclul ureogenetic* sau *Krebs -Henseleit* (fig. 6.7).

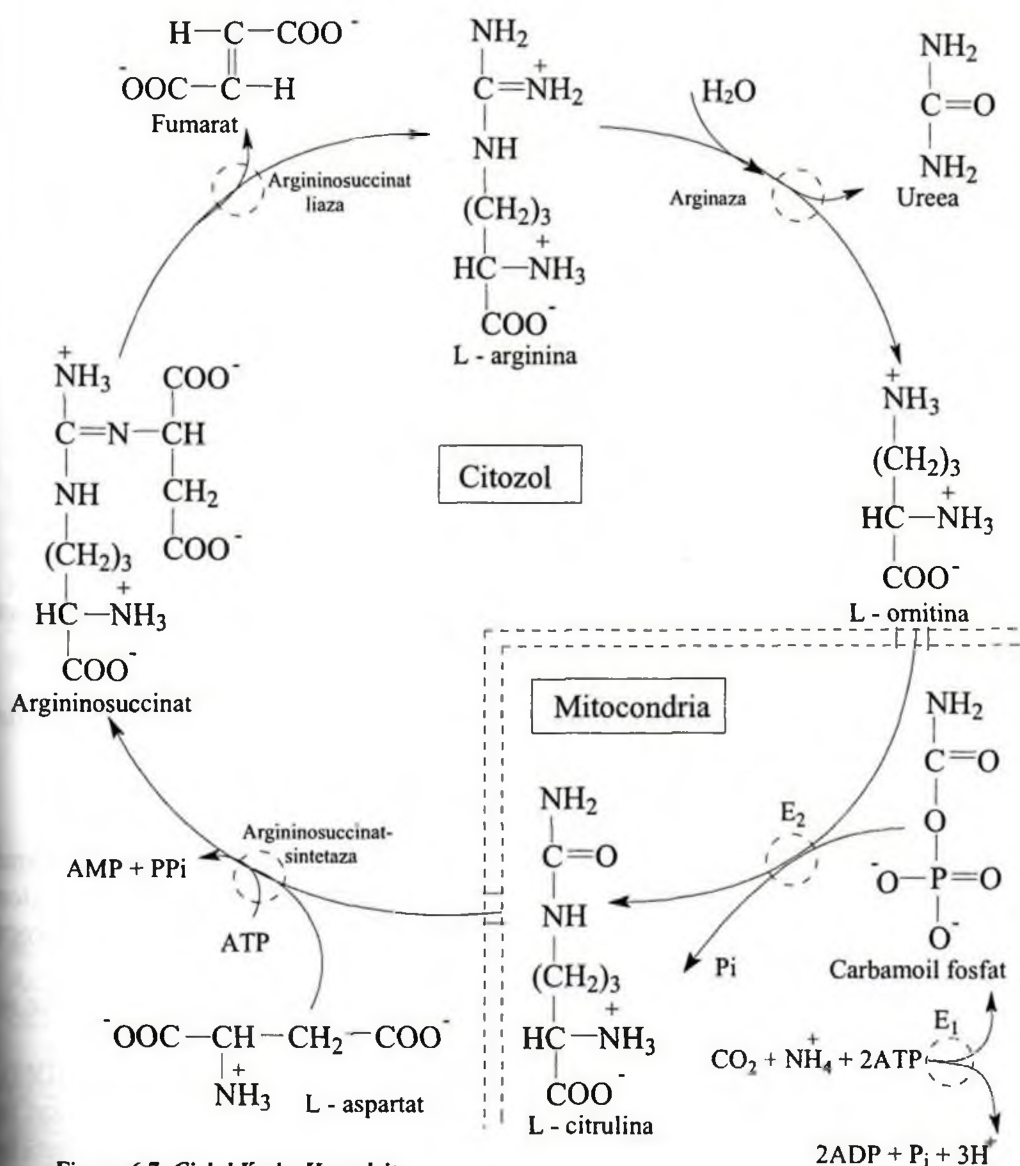
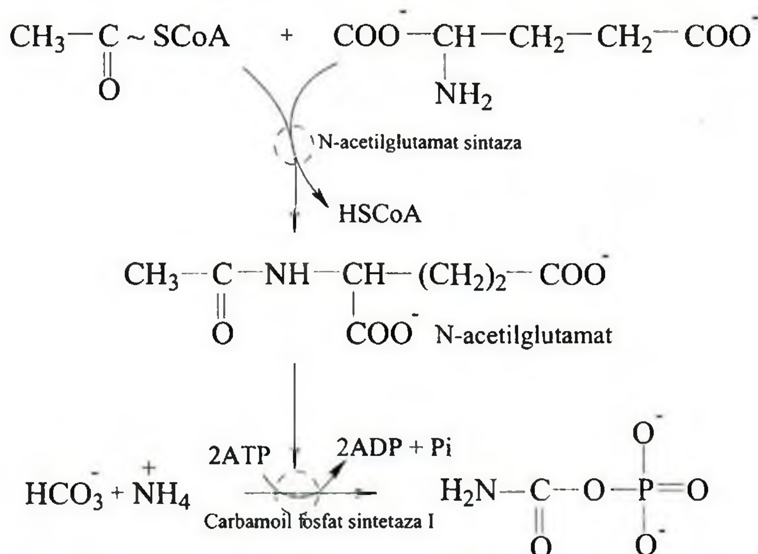
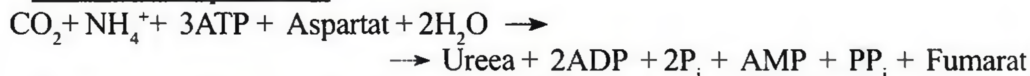


Figura 6.7. ***Ciclul Krebs-Henseleit***

Debutul în interiorul mitocondriilor rezidă din condensarea NH_4^+ şi CO_2, cu formarea carbamoil fosfatului.

Enzima *carbamoil fosfat sintetaza* (E_1) este alosterică, modulată de mai mulţi efectori, stabilizînd forma sa activă - N-acetilglutamatul. Reacţia necesită şi ioni de Mg^{2+}. În prezenţa acestor factori, au loc modificări conformaţionale majore în carbamoil fosfat sintetază şi amplificarea afinităţii la ATP. Utilizarea a 2 molecule ATP determină ireversibilitatea sintezei carbamoil fosfatului. Enzima conţine biotină. Apoi, tot în mitocondrii, are loc sinteza citrulinei, reacţie catalizată de *L-ornitin-carbamoil transferaza* (E_2).





Sinteza N-acetilglutamatului şi rolul lui de activator în sinteza carbamoil fosfatului

Citrulina difuzează în citozol şi reacţiile continuă în acest compartiment, conform schemei de mai sus (fig. 6.7).

Reacţia catalizată de *argininsuccinat-liază* posedă stereospecificitate.

Arginaza e dependentă de conţinutul Mn^{2+} şi Co^{2+} şi este inhibată competitiv de ornitină şi lizină.

<u>Stoichiometria procesului</u>:

$$CO_2 + NH_4^+ + 3ATP + \text{Aspartat} + 2H_2O \longrightarrow$$
$$\longrightarrow \text{Ureea} + 2ADP + 2P_i + AMP + PP_i + \text{Fumarat}$$

Formarea unei molecule de uree necesită scindarea a 4 legături macroergice (ceea ce constituie aproximativ 15% din energia aminoacizilor care servesc drept sursă de NH_4^+).

Ureea este netoxică, foarte solubilă. Ea nu are prag de eliminare renală şi tot ce se sintetizează, se elimină prin urină.

Acidul fumaric este convertit în acid oxaloacetic (sub acţiunea fumarazei şi MDH), care va regenera acidul aspartic prin transaminare. Oxaloacetatul este utilizat în gluconeogeneză sau convertit în citrat. *Interconversia metaboliţilor* e reflectată în figura 6.8.

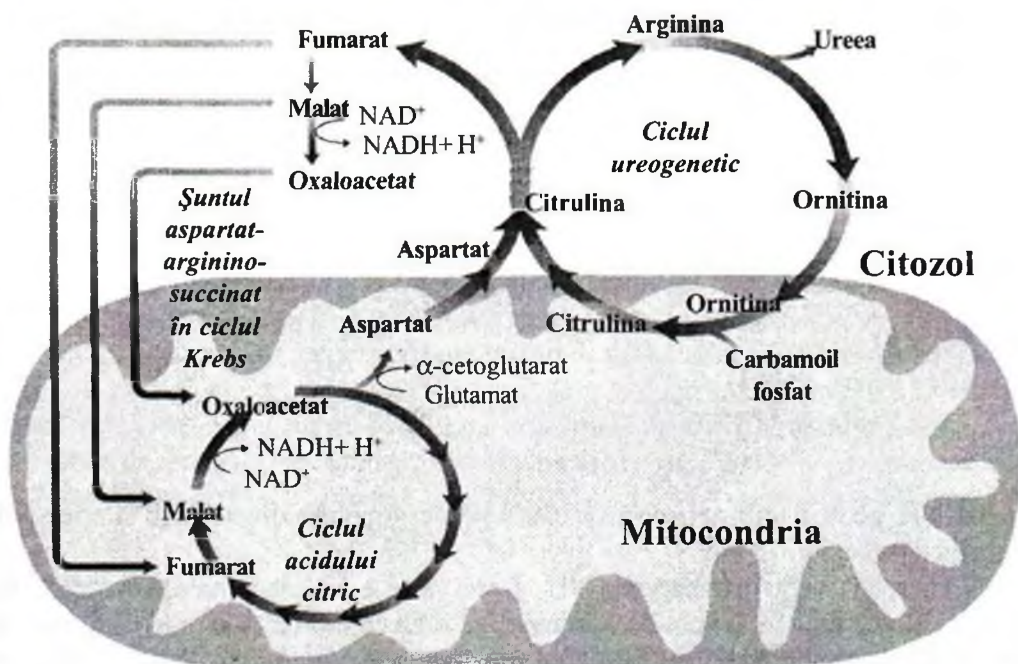
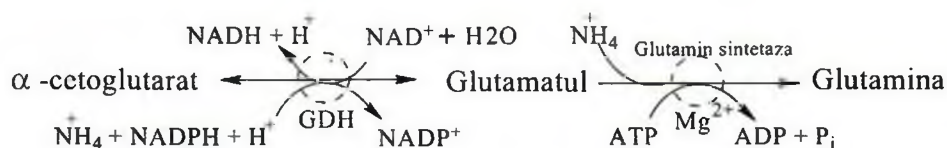


Figura 6. 8. ***Interconversia metaboliţilor***

Amoniacul e foarte toxic pentru organismul uman. Insuficienţa unor enzime din ciclu, îndeosebi a primelor două (*carbamoil-fosfat-sintetaza* şi *transcarbamoillaza*), provoacă comă şi exitus după naştere (hiperamoniemie tip I şi tip II). Un simptom concludent este *hiperamoniemia*. Insuficienţa parţială provoacă defecte în dezvoltarea mintală, letargie, vomă, iar o raţie cu insuficienţă de proteine micşorează NH_4^+ în sînge. Formele uşoare ale afecţiunii se supun redresării simptomaticii clinice. Lipsa *argininosuccinat sintetazei* conduce la *citrulinemie*, concomitent cu eliminarea masivă prin urină a acestui compus. Absenţa *arginazei* se caracterizează prin creşterea nivelului argininei în sînge şi lichidul cerebrospinal.

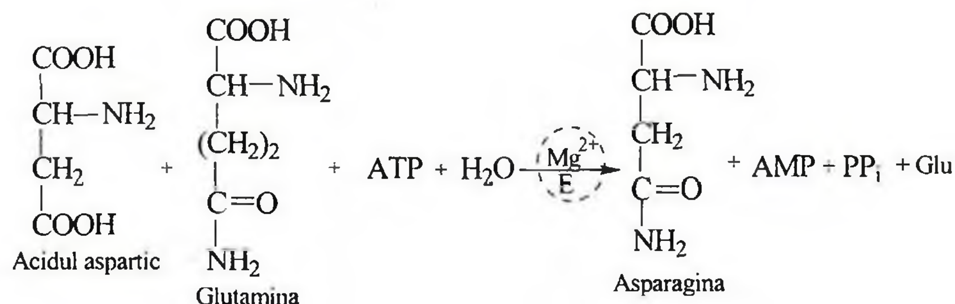


Efectul toxic al amoniacului se explică prin concentraţia mare de ioni de amoniu, ce dezechilibrează reacţia catalizată de glutamat dehidrogenază, cu formarea glutamatului. Acesta epuizează concentraţia de α-cetoglutarat— produs intermediar al ciclului Krebs, cu reducerea reacţiilor de generare a ATP, ce deregleaza, în primul rînd, funcţia creierului.

Ultima reacţie e însoţită de crearea unui produs intermediar macroergic fixat de enzimă (glutamil-5-fosfat). Centrul activ al *glutamin sintetazei*, adiţionînd NH_4^+, formează glutamina, cu eliberarea fosfatului.

II. În ţesuturile mamiferelor are loc şi *sinteza asparaginei* în complex cu glutamina sau NH^+_4.

Reacția e catalizată de asparagin-sintetaza glutamin dependentă sau amoniac dependentă.



III. NH_3 poate fi utilizat pentru sinteza argininei și a pirimidinelor prin intermediul carbamoil fosfatului.

IV. Un rol deosebit în transportul NH_4^+ îl are *alanina*. NH_3 se formează în mușchi la fel ca și în alte țesuturi, la scindarea aminoacizilor. La un efort fizic în mușchii scheletali are loc dezaminarea AMP, cu formarea *inozinmonofosfatului* (IMP). NH_3 eliberat este transportat prin *ciclul glucozo-alaninic* (fig. 6.9).

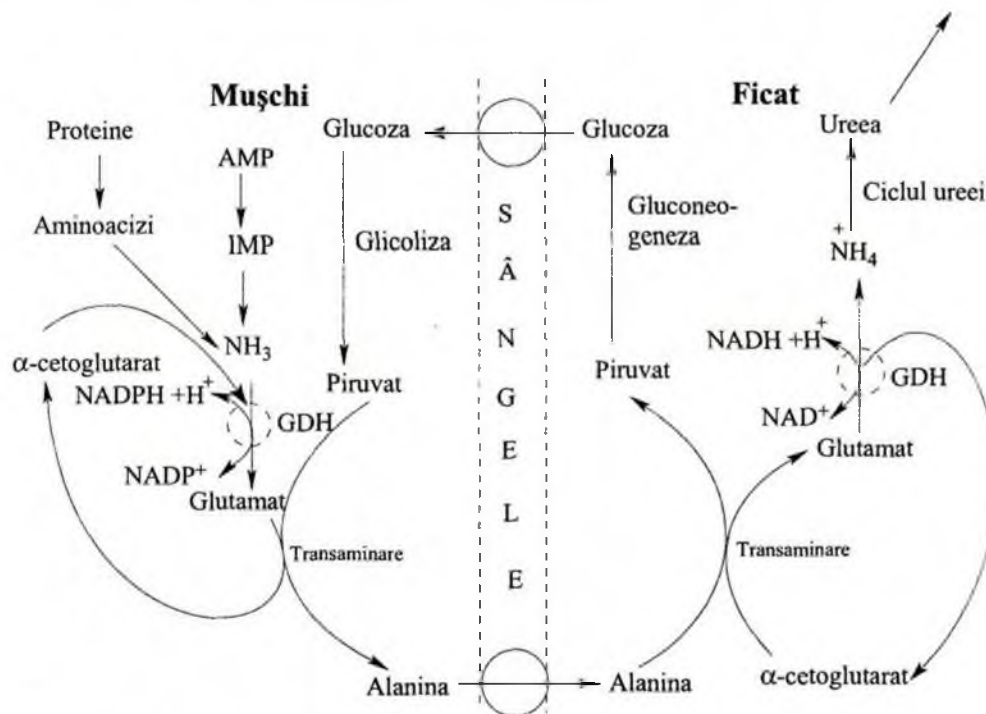


Figura 6.9. ***Ciclul glucozo-alaninic***

Utilizarea scheletului de carbon al aminoacizilor

Strategia degradării aminoacizilor constă în formarea principalelor produse intermediare ale metabolismului, care pot fi transformate în glucoză sau oxidate în ciclul Krebs.

Scheletul de carbon al celor 20 aminoacizi se modifică în numai 7 molecule: piruvat, acetil-CoA, acetoacetil-CoA, α-cetoglutarat, succinil-CoA, fumarat, oxaloacetat. E un exemplu de economie judicioasă şi maximă a modificărilor metabolice (vezi fig.6.10).

*Aminoacizii, ce produc acetil-CoA sau acetoacetil-CoA, sunt denumiţi **cetogeni**,* la degradarea lor se majorează concentraţia corpilor cetonici. Ceilalţi ***glucogenici*** produc glucoza, prin transformările prealabile în fosfoenolpiruvat. Numai un singur aminoacid — *leucina* —este exclusiv cetogen. Ile, Lys, Phe, Tyr şi Trp constituie aminoacizi, la care unii atomi de C apar în acetil-CoA sau acetoacetil-CoA, pe cînd alţi atomi de carbon — în precursorii potenţiali ai glucozei. Ceilalţi 14 aminoacizi sunt pur glucoformatori.

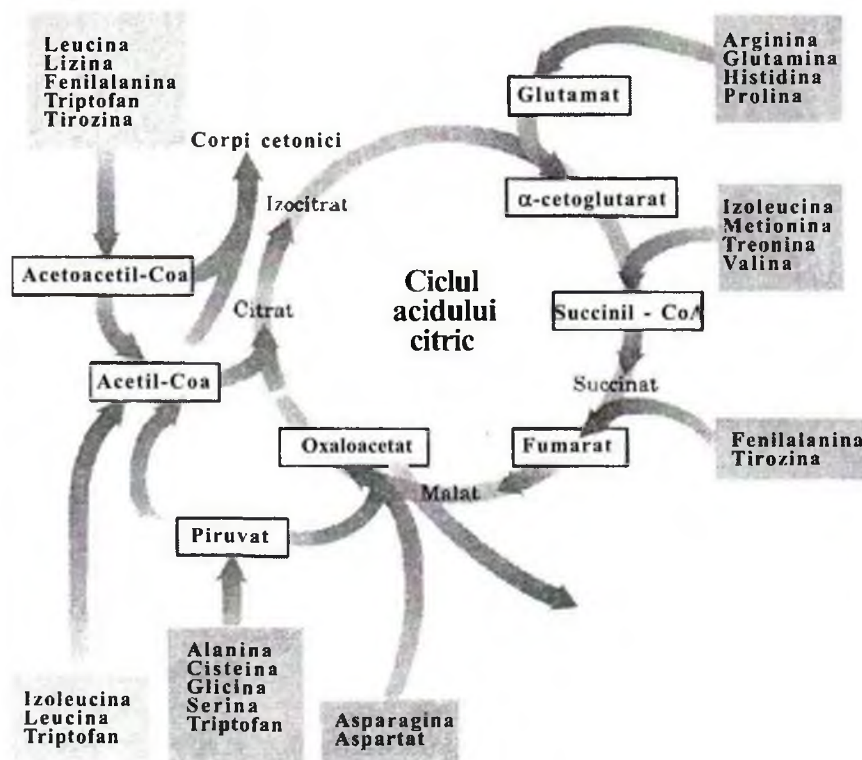
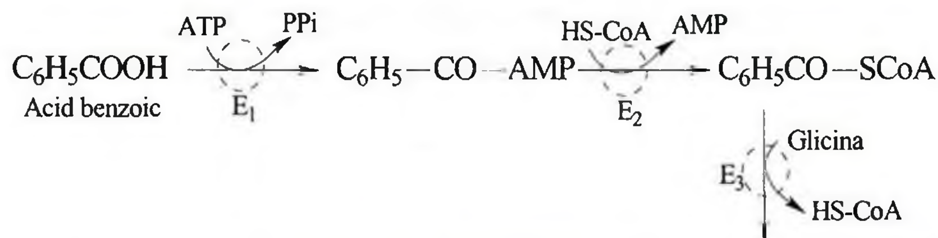


Figura 6.10. ***Utilizarea scheletului de carbon al aminoacizilor***

Metabolismul glicinei (1)

Glicina favorizează eliminarea unor compuşi toxici din organism, de exemplu, acidul benzoic; ultimul este activat, apoi fixat de grupa aminică a glicinei, cu formarea acidului hipuric (depistat în urina de cal).

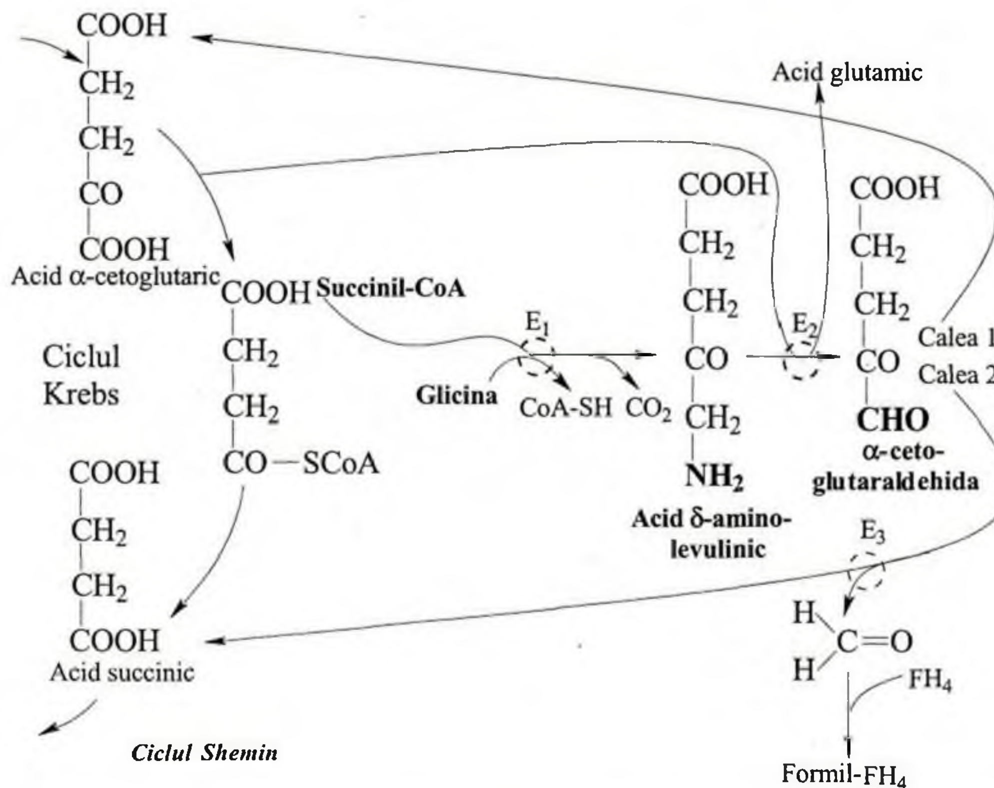




Printr-un mecanism similar sunt activaţi şi acizii colic şi dezoxicolic, apoi conjugaţi cu glicină pentru formarea acizilor glicocolic şi glicodezoxicolic.

Glicina ia parte în sinteza glutationului, creatinei, acidului δ-aminolevulinic (precursorul hemului).

Glicina participă şi în *ciclul lui Shemin*, care reprezintă o derivaţie a ciclului Krebs la etapa succinil-CoA. Cele trei etape ale ciclului sunt redate mai jos.



Ciclul Shemin

– Prima etapă constă în condensarea succinil-CoA şi glicinei, cu formarea *acidului δ-aminolevulinic*, reacţie catalizată de *sintaza* respectivă, avînd ca coenzimă piridoxalfosfatul.

- În continuare, rapid este transaminat cu acidul α-cetoglutaric, formînd o funcţie aldehidică.

- L-α-cetoglutaraldehida obținută se reîntoarce în ciclul Krebs, la o simplă oxidare (calea I) sau, cedînd o structură unicarbonică, se transformă în acid succinic.

Reacțiile cu implicarea glicinei și a serinei sunt redate în fig. 6.11, unde se reproduce metabolismul, în ansamblu, cu participarea acestor aminoacizi.

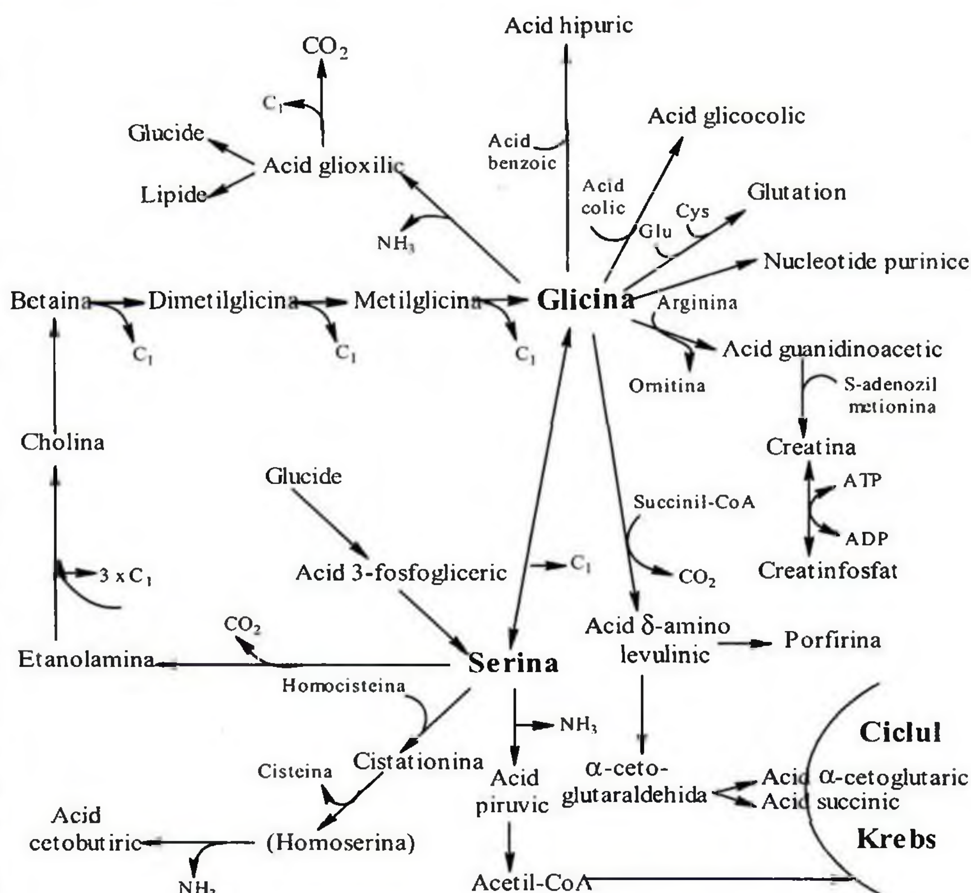


Figura 6.11. ***Schema, în ansamblu, a metabolismului glicinei și serinei***

Catabolismul glicinei are loc primordial în celulele ficatului. Complexele enzimatice prezintă agregate macromoleculare și sunt localizate în mitocondrii. *Glicinuria* ce se observă în unele cazuri e dependentă de sex (X-cromozom) și e în corelație cu tulburările de absorbție în tubii renali; fenomenul are loc la conținut normal de glicină în sînge.

O altă afecțiune se caracterizează cu o *excreție majoră de oxalat*, independentă de alimentarea cu oxalați. La progresarea maladiei are loc formarea calculilor în căile urinare, cu apariția nefrocalcinozei și o infecție recidivă a căilor urinare. Insuficiența renală și hipertonia sunt cauzele decesului în fragedă vîrstă. Surplusul de oxalat e de natură endogenă, probabil se formează din glicină (dezaminarea glicinei duce la formarea *glioxilatului* — precursorul oxalatului). Defectul metabolic constă în dereglarea metabolizării glioxilatului, transformării lui în formiat sau glicină și, în consecință, glioxilatul

se transformă în oxalat (vezi metabolismul serinei). E verosibil că dereglarea ereditară — *hiperoxaluria primară* — este consecința insuficienței glicintransaminazei și a dereglărilor oxidării glioxilatului în formiat.

Catabolismul aminoacizilor poate fi clasat în cîteva grupe:

I. Familia aminoacizilor cu C_3

Include următorii aminoacizi: *alanina, serina, cisteina, cistina, metionina.*

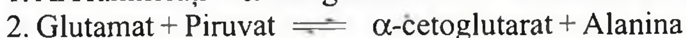
Metabolismul alaninei (2) Alanina este un aminoacid cardinal glucoformator. Prin transaminare formează direct acidul piruvic.


a) Alanina + α-cetoglutarat $\overset{TA}{\rightleftharpoons}$ Piruvat + Glutamat


b) Glu + NAD^+ + H_2O $\overset{GDH}{\rightleftharpoons}$ α-cetoglutarat + NH_4^+ + NADH + H^+

Piruvatul format în citoplazma este transportat în mitocondrii. Catabolismul Ala are loc preponderent în ficat și muschii scheletali, unde formează un ciclu de transformări, ce constituie ciclul alaninei. Catabolismul proteinelor musculare generează cantități majore de alanină. Ea rezultă și din catabolismul aminoacizilor ramificați prin 2 reacții de transaminare:

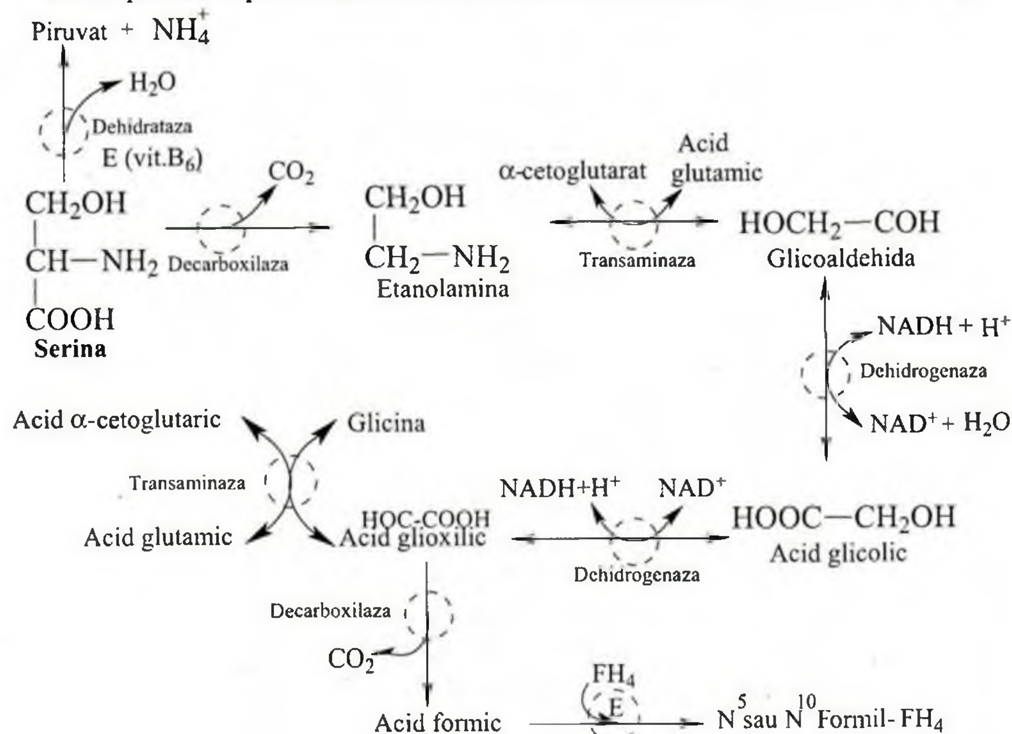

1. AA ramificați + α-cetoglutarat $\rightleftharpoons$ α-cetoacizi ramificați + Glutamatul


2. Glutamat + Piruvat $\rightleftharpoons$ α-cetoglutarat + Alanina

Alanina este convertită în piruvat, permițînd formarea glucozei. Și triptofanul, printr-o succesiune de reacții generează alanina, dar concomitent este și un aminoacid cetoformator.

Metabolismul serinei (3)

Serina poate fi supusă următoarelor modificări (vezi și transformările treoninei):



Etanolamina, produsul decarboxilării, poate fi utilizată în sinteza cholinei prin intermediul *acidului fosfatidic* şi al *S-adenozil metioninei.* Cholina este oxidată apoi la betaină, după care pierderea celor trei grupe CH_3 va finaliza cu generarea glicinei (fig.6.12)

H_3C / $H_3C-\overset{+}{N}-CH_2-CH_2OH$ / H_3C Cholina → $H_3C-\overset{+}{N}(CH_3)_2-CH_2-COO^-$ Betaina → $(CH_3)_2N-CH_2-COOH$ Dimetilglicina → $CH_3-NH-CH_2-COOH$ Metilglicina (sarcozina) → H_2N-CH_2-COOH Glicina

Fosfatidilcholina ← CH_3 ← Fosfatidildimetiletanolamina ← CH_3 ← Fosfatidilmetiletanolamina ← CH_3 ← Fosfatidiletanolamina ← $H_2N-CH_2-CH_2OH$ Etanolamina

S-adenozil metionina ↔ Derivaţi unicarbonici fixaţi de FH_4

Serina $HOCH_2-CH(NH_2)-COOH$ → Etanolamina + CO_2; Serina ⇌ Glicina + CH_2OH

Fig. 6.12. ***Formarea glicinei din etanolamină prin generarea cholinei***

Prin dezaminarea oxidativă (sub influenţa unei *glicinoxidaze specifice*) sau prin transaminarea reversibilă, glicina este transformată în *acid glioxilic*, care poate fi momentan decarboxilat oxidativ în CO_2 plus *acidul formic* care nu este eliberat, dar captat de FH_4 pentru formarea N^5-formil-FH_4 sau N^{10}-formil-FH_4.

Acidul glioxilic format şi din izocitrat, reacţie catalizată de o *izocitratază*, este condensat cu acetil-CoA în acidul malic.

$HOOC-CH_2-CH(COOH)-CH(OH)-COOH$ (Acid izocitric) —Izocitrataza→ $HOOC-CH_2-CH_2-COOH$ (Acid succinic) + $OHC-COOH$ (Acid glioxilic)

Acid glioxilic + $CH_3-CO-S-CoA$ —Acid malic sintaza→ $HOOC-CH_2-CH(OH)-COOH$ (Acid malic) + $CoA-SH$

S-a constatat că acidul glioxilic este un metabolit de contact între metabolismul glucidic şi lipidic (fig.6.13).

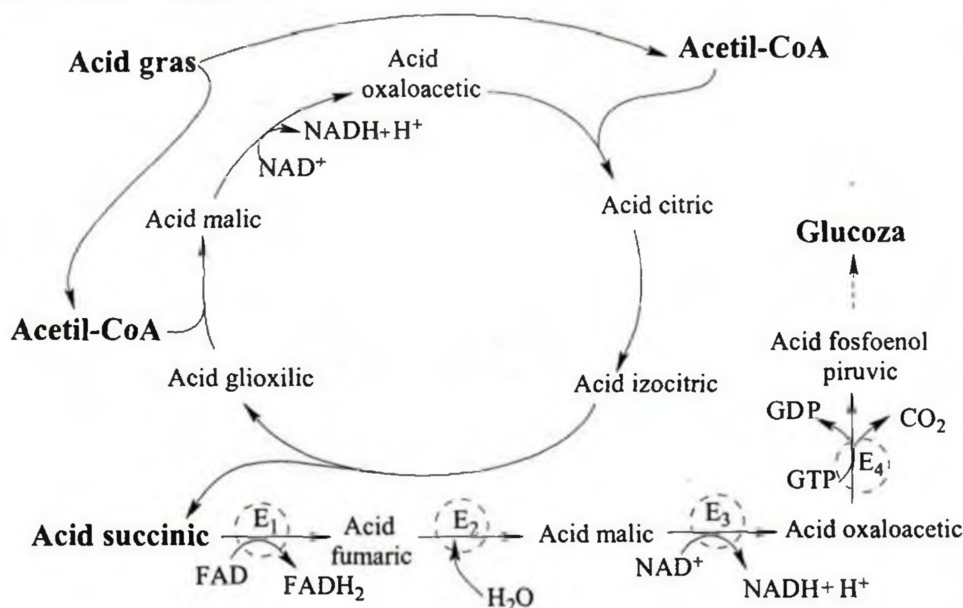
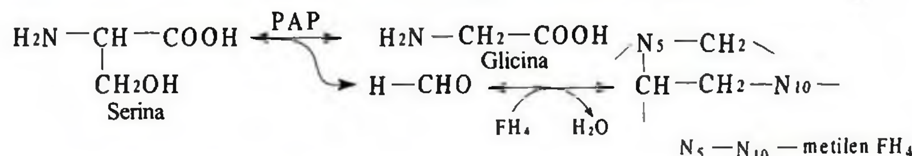


Figura 6.13. ***Transformările acetil-coenzimei A în glucoză în ciclul acidului glioxilic***

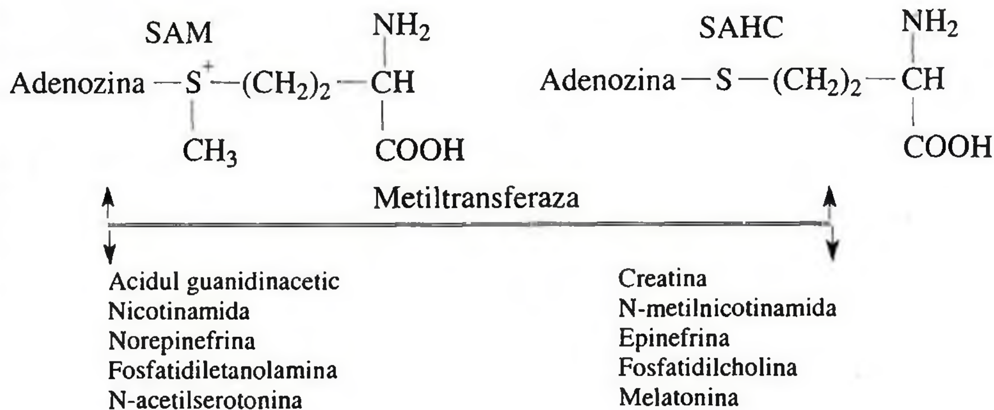
Serina poate fi convertită în glicină graţie unei enzime *specifice — serin-hidroximetil transferaza* care transferă grupa formil. Enzima necesită două coenzime: la prima etapă are loc formarea unei baze Schiff intermediară între serină şi PAP. În faza a doua enzima eliberează glicina şi transferă formaldehida pe tetrahidrofolat (FH_4) prin eliberarea unei molecule de apă şi formarea de N_5—N_{10}—metilen—FH_4. Ultimul compus poate fi transformat de alte enzime în N_5— metil —FH_4 sau în N_5— (N_{10}—) formil FH_4



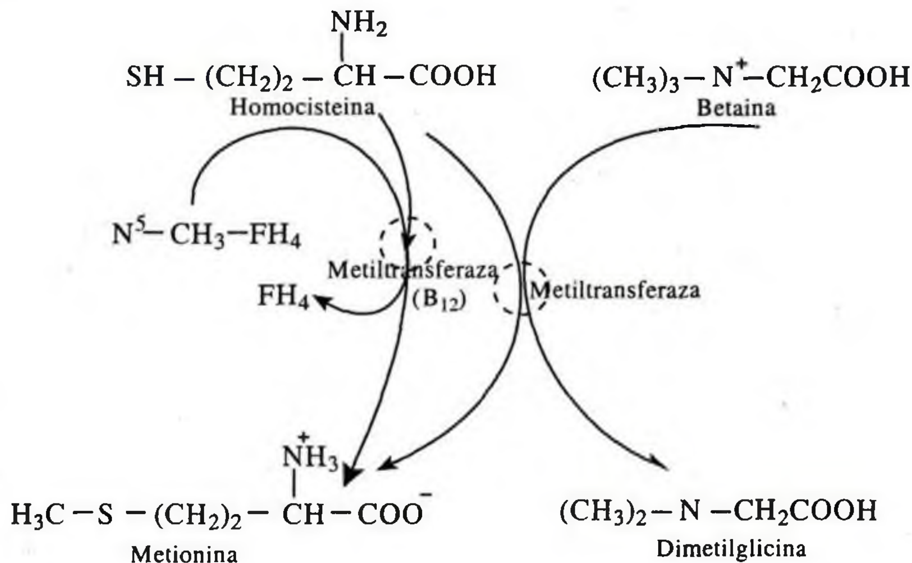
Metabolismul aminoacizilor ce conţin sulf (metionina, cisteina(4) şi cistina(5))

Ultimii doi sunt interconvertibili prin oxidare-reducere. *Metionina*, pentru şobolani şi om, este indispensabilă, dar nu atunci cînd se furnizează suficient cisteină. S-a stabilit că atunci cînd se administrează cisteină, necesităţile de metionină se diminuează, ceea ce sugerează că o parte din cisteină este utilizată pentru sinteza metioninei, fapt confirmat prin studiile realizate, cu utilizarea izotopilor radioactivi.

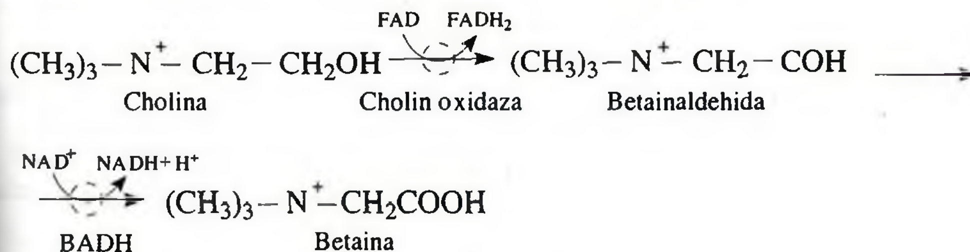
Calea de degradare a metioninei este redată în fig. 6.26. Metionina activă este principalul donator de grupe metilice — CH_3, S-adenozil metionina (SAM) graţie enzimei specifice metiltransferazei donează grupa CH_3 unor substraturi cu formarea S-adenozil homocisteinei (SAHC):



Metionina poate fi restabilită prin transferul grupelor metil ai betainei pe homocisteină, reacție catalizată de o metiltransferază sau donator al acestor grupe poate fi N^5 – metiltetrahidrofolatul ($N^5 - CH_3 - FH_4$) ce conține și vitamina B_{12}:

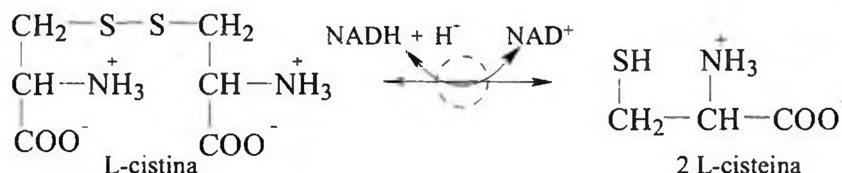


Betaina (acid) se obține la oxidarea cholinei în cîteva etape:



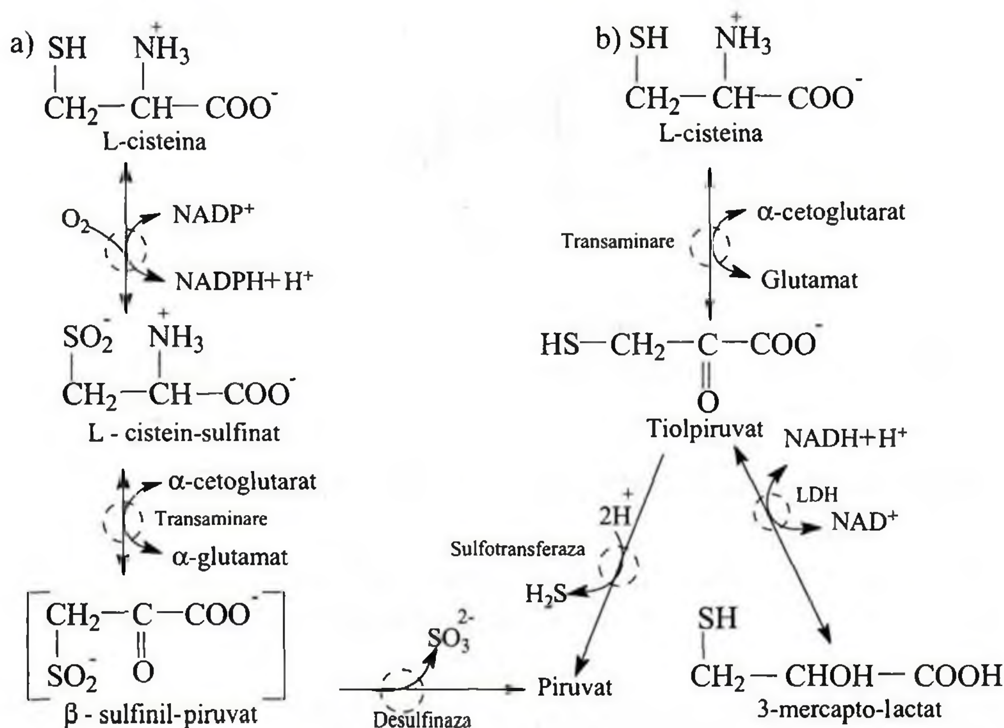
Sulful, ca şi azotul şi carbonul, îşi are în biosferă ciclul său, care se realizează graţie activităţii metabolice a organismelor pro- şi eucariote. Vertebratele nu posedă mecanisme de a forma sulf organic, ele participă în catabolismul compuşilor organici în neorganici. Organismul uman excretă aproximativ 20-30 mmol de sulf în 24 ore, cota sulfatului neorganic e de 80%.

O cale cardinală de metabolizare este transformarea cisteinei în reacţia catalizată de cistein reductază:



Cisteina poate fi metabolizată pe două căi principale: oxidarea directă (a) şi prin pereaminare (b):

a) Transformările cisteinei în cistein-sulfinat sunt catabolizate de cistein dioxigenaza - enzimă ce necesită Fe^{2+} şi NADPH. Catabolizarea în continuare include reacţia de pereaminare, cu formarea *β–sulfinil-piruvatului*. Se consideră că transaminaza respectivă e identică cu glutamat : aspartat transaminaza. Intermediarul sus redat nu a



fost identificat, dar transformările de mai departe se realizează pe cale nefermentativă.

b) Transaminarea reversibilă în tiolpiruvat e catalizată de transaminaze specifice. 3-mercaptopiruvatul este redus în reacția catalizată de L-lactat dehidrogenază. Produsul format e component normal al urinei la om, în formă de amestec de disulfid cu cisteina. Modificările alternative vor conduce la formarea piruvatului și H_2S.

După unele date științifice, cisteina este transformată în acid piruvic, ce prezintă o dezaminare catalizată de *cistein desulfhidraza*. Cisteina este oxidată în *acidul cistein-sulfinic*, care prin transaminare pierde grupa aminică, generînd *acidul sulfinil-piruvic*. Ultimul, cedînd sulful sub formă de sulfit, apoi sulfat, va da acidul piruvic. Sulfatul e activat în formă de 3'-fosfat-5'-fosfo-sulfat, care va neutraliza compușii toxici și se va elimina ca sulfoconjugați prin urină.

O cale de metabolizare constă în decarboxilarea acidului cistein-sulfinic în *hipotaurină* oxidată în taurină. Ultima poate fi formată și prin formarea acidului cisteic și decarboxilarea lui. Taurina, ca și glicina, poate fi conjugată cu acizii biliari (fig. 6.14).

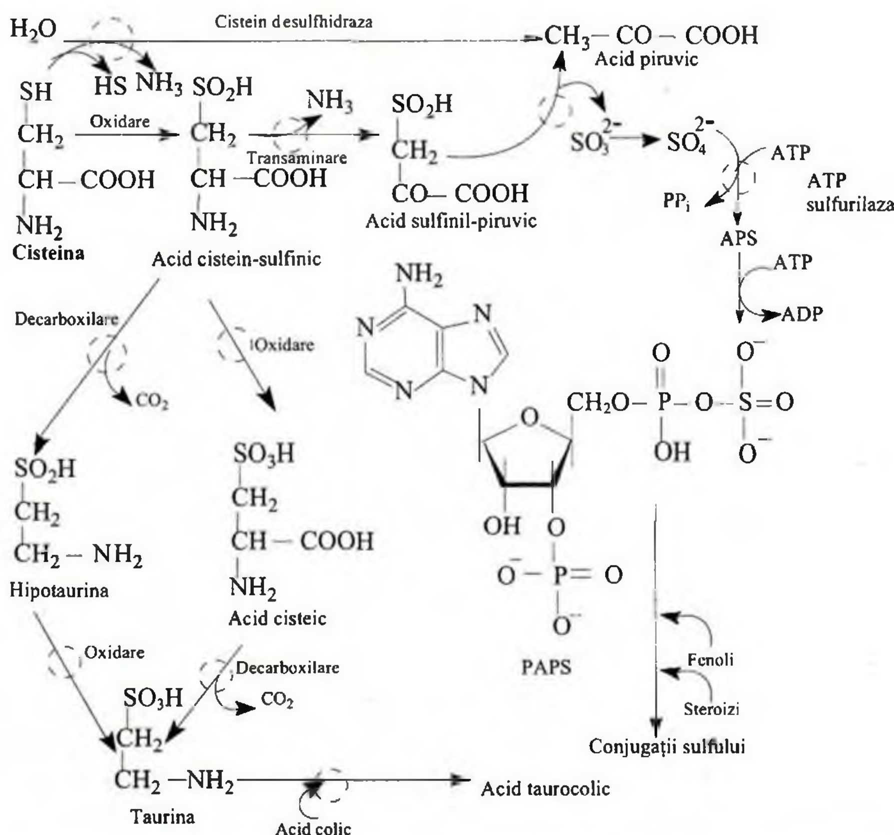


Figura 6.14. ***Metabolismul cisteinei (APS -adenozin 5'- fosfosulfat, PAPS - fosfoadenozin 5'-fosfosulfat)***

O schemă de asamblare a reacțiilor de metabolizare a aminoacizilor ce conțin sulf e redată în figura 6.15.

Metionina — Homocisteina
ATP
CH_3
Serina
PPi+Pi
Glutation
Mercaptoetanolamina
Glu
Gly
CO_2
Coenzima A
S-adenozilmetionina
Cistationina
Cisteina
Cistina
Acid cisteic
CO_2
Etanolamina
Acid guanidinoacetic
Noradrenalina
tRNA nemetilată
Homoserina
Acid cistein sulfinic
Taurina
H_2S
NH_3
NH_3
tRNA metilată
Adrenalina
Creatina
Cholina
Treonina
Acid sulfinil piruvic
CO_2
Hipotaurina
Izoleucina
SO_3^-
Acid colic
S-adenozilhomocisteina
Acid α-cetobutiric
Acid piruvic
SO_4^-
Acid taurocolic
CoASH
CO_2
Acetil-CoA
ATP
Adenozin 3'-fosfo-5'-fosfosulfat
Propionil-CoA
Ciclul Krebs
Glucide
Conjugații sulfului

Figura 6.15. ***Schema de asamblare a metabolsmului aminoacizilor ce conțin sulf***

În sumar, scindarea cisteinei pe diferite căi metabolice poate da:

Cisteina ⟶ Piruvat + SO_3^{2-} + NH_4^+ + SCN^- + H_2S

Dereglările metabolismului aminoiacizilor ce conțin sulf

A. *Cistinuria (cistin-lizinuria)* — afecțiune metabolică ereditară în care excreția cistinei e majorată de 20-30 de ori. Se elimină, de obicei, lizina, arginina și ornitina. Se presupune prezența dereglărilor în reabsorbția acestor patru aminoacizi în tubii renali, ce se realizează în același fragment renal. Solubilitatea mică a cistinei favorizează formarea calculilor în tubii renali. În urina bolnavilor se depistează și L-homocisteină. În cazul respectiv se micșorează tendința de formare a calculilor (L-homocisteina are o solubilitate mai mare).

B. *Cistinoza* — afecțiune ereditară, cu formarea cristalelor de cistină în țesuturi și organe (predominant, în sistemul reticulo-endotelial). Se depistează și o aminoacidurie totală. Dereglări evidente în rinichi, cu fenomene de insuficiență renală în copilărie. Se consideră că dereglările cardinale sunt localizate în lizozomi (deficit al transportatorului lizozomal pentru cistină).

C. *Homocisteinuria* se excretă împreună cu S-adenozil-metionina (pînă la 30 mg în 24 de ore). Sunt caracterizate patru tipuri de homocisteinurie:

Tip I — este defectată enzima cistationin-β-sintaza (în deficit al transportului lizozomal pentru cisteină), se întîlnește osteoporoza, tromboza, retard mintal, dereglări ale cristalinului. Sunt două forme sensibilă și nesensibilă la vit. B_6.

Dieta cu conținut mic de metionină şi mare de cistină preîntîmpină dereglările din fragedă copilărie.

Tip II — este defectată N^5, N^{10}-metilen-FH_4-reductaza.

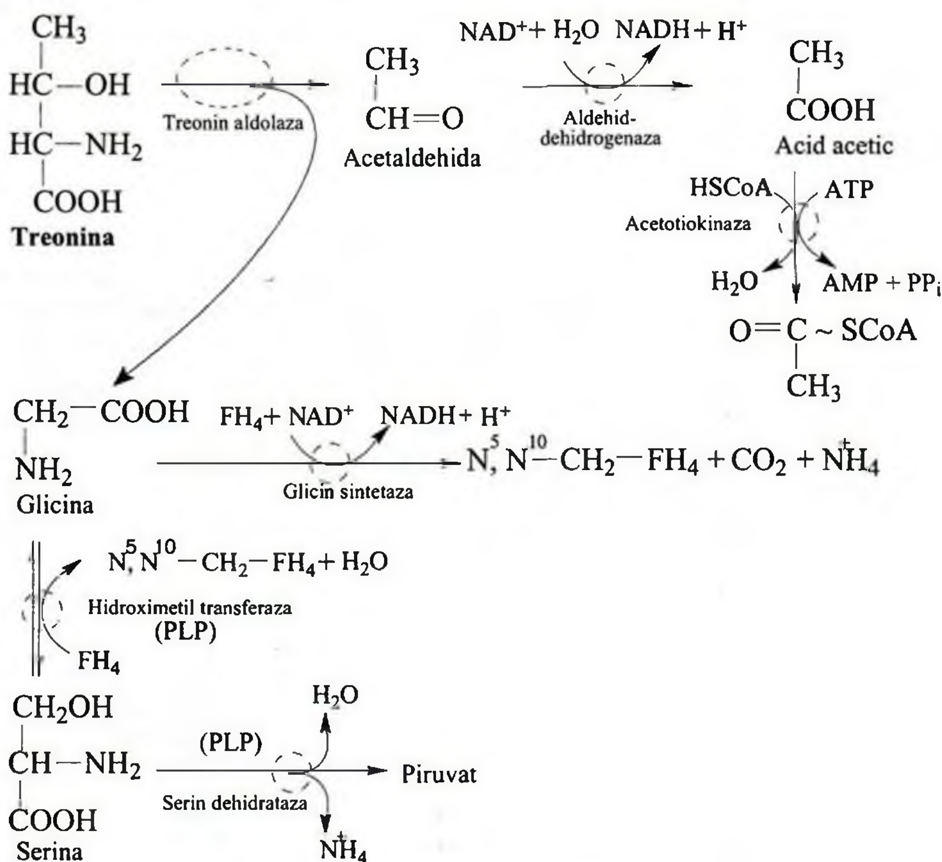
Tip III — o activitate mică o are N^5-metilen-FH_4: homocistein transmetilaza determinată de tulburările în sinteza metilcobalaminei.

Tip IV — o activitate minimă a N^5-metilen-FH_4- homocistein transmetilazei, cauzată de dereglările absorbției cobalaminei în intestin. Adausul vitaminelor B_{12}, B_6 şi a acidului folic reduc nivelul ridicat în ser de homocisteină, micşorează morbiditatea şi mortalitatea de afecțiunile vasculare aterosclerotice cauzate de hiperhomocisteinemie.

II. Familia aminoacizilor cu C_4

Include următorii aminoacizi: treonina, acidul aspartic, asparagina.

Metabolismul treoninei (6) poate fi redat în felul următor:

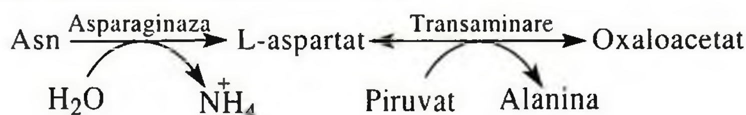


Metabolismul acidului aspartic(7) şi al asparaginei(8)

Acidul aspartic este format prin transaminare din acidul oxaloacetic şi singur poate ceda grupa aminică prin transaminare pentru formarea altor aminoacizi. Oxaloacetatul ocupă un loc-cheie în ciclul Krebs — captează moleculele de acetil-CoA provenite din glucide şi lipide şi, de alfel, e punctul de plecare pentru gluconeogeneză. Acidul aspartic se poate încadra în ciclul Krebs prin acidul fumaric, după dezaminarea sa.

De asemenea, este un precursor în sinteza nucleotidelor purinice şi pirimidinice, are un rol important în ureogeneză. Fiind decarboxilat, se formează β-alanina — un constituent al coenzimei A. În prezența ATP, acidul aspartic adiționează amoniac, formînd asparagina — o formă-rezervă de amoniac la vegetale.

De altfel, asparagina poate fi transaminată:



Asparagina + α-cetoglutarat ⇌ Glutamat + Acid α-cetosuccinic

Ultimul acid e scindat de o ω-amidază, cu eliberarea OA + NH_3 + H_2O.

La unele organisme (bacterii, vegetale, levuri), acidul aspartic este precursorul în sinteza treoninei, izoleucinei, metioninei şi lizinei. La om, însă, aceşti patru aminoacizi sunt indispensabili. Schematic, mai jos, sunt demonstrate implicațiile în metabolism ale acizilor glutamic, aspartic şi amidelor lor (fig.6.16).

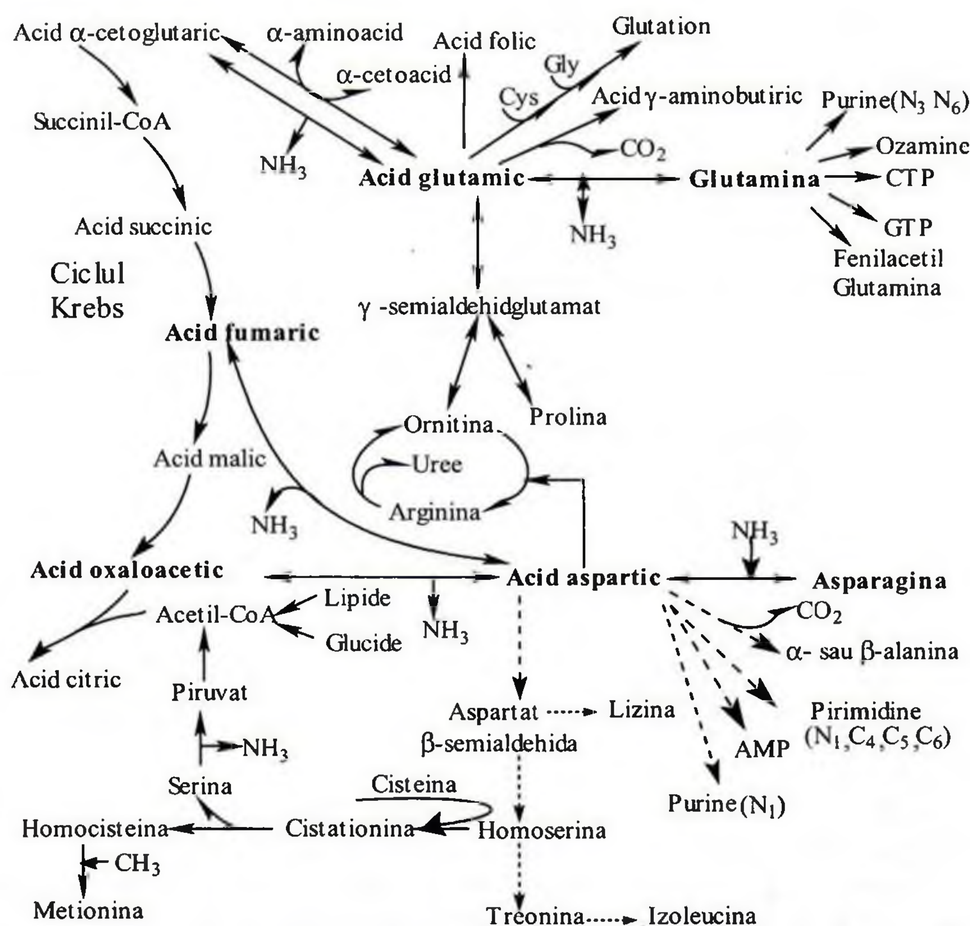


Figura 6.16. ***Schema de asamblare a metabolismului acizilor glutamic şi aspartic şi ale amidelor lor***

III. Familia aminoacizilor cu C_5

Include următorii aminoacizi: arginina, glutamatul, glutamina, prolina, histidina.

Metabolismul acidului glutamic(9) şi al glutaminei (10)

Acidul glutamic, ca şi acidul aspartic, precum şi aminele respective ocupă un loc important în metabolismul compuşilor azotaţi. S-a constatat deja că acidul glutamic este calea cardinală de utilizare a amoniacului în compuşii biologici şi este situat în calea celorlalţi aminoacizi. Împreună cu amida sa, glutamina joacă un rol principal în stocarea şi eliminarea amoniacului. Contribuie, de asemenea, în biosinteza nucleotidelor purinice.

Se constată că unii aminoacizi derivă din acidul aspartic şi, de altfel, el participă şi la sinteza nucleotidelor purinice şi pirimidinice şi e necesar pentru formarea ureei. Aceşti doi aminoacizi sunt egal importanţi în metabolismul intermediar general: α-cetoacizii lor sunt intermediatele ciclului Krebs şi constituie punctele de contact între metabolismul glucidic şi proteic.

Acidul glutamic se formează din acidul α-cetoglutaric prin aminarea reductivă sau prin transaminare. El participă în procesele de transaminare, cedînd grupa aminică pentru formarea altor aminoacizi. La decarboxilare, se generează acidul γ-aminobutiric — un mediator de inhibiţie în sinapse, ce sunt localizate la nivelul creierului. Este necesar pentru sinteza glutationului, e constituent al acizilor pteroilglutamic şi folic, cu rol decisiv în transportul unităţilor monocarbonice.

Corelaţia între acidul glutamic, ornitină, prolină, arginină (cu un rol deosebit în sinteza ureei) este ilustrată în figura.6.16. Reacţiile respective sunt reversibile.

Glutamina permite stocarea amoniacului, care-i toxic pentru ţesuturile animale şi este, deci, un intermediat în eliminarea amoniacului pe căile urinare. La mamifere provine prin hidroliza glutaminei sanguine la nivelul rinichilor. Reglează homeostazia acido-bazică prin reacţia *glutaminazei* (elimină NH_3). Ultimul este eliminat sub forma ionului de amoniu, impreună cu protonii prezenţi în filtratul primar. S-a elucidat formarea glutaminei din acidul glutamic şi vom vedea în continuare utilizarea azotului amidic în sinteza nucleotidelor purinice, formarea carbamoil fosfatului şi aminarea UTP la CTP. Glutamina ia parte la formarea *ozaminelor*. Ca şi glicina, participă în procesele de dezintoxicaţie, de exemplu, a acidului fenilacetic, care este excretat sub forma combinată cu α-aminogrupa glutaminei (vezi metabolismul fenilalaninei). Glutamina este şi un substrat energetic, prin conversia sa în intermediarii ciclului Krebs, în ţesuturile cu ritm rapid de diviziune celulară (1 moleculă de glutamină eliberează 24 moli de ATP). Glutamina reprezintă 60% din fondul aminoacidic prezent în muşchi, unde are loc o sinteză activă a ei. *Glutamin sintetaza* musculară necesită un aport de NH_3, obţinut prin dezaminarea AMP generată la un efort fizic întens sau prelungit.

Metabolismul prolinei (11)

Conform schemei redate în fig. 6.17, toţi cei cinci atomi de carbon ai prolinei se vor afla în α-cetoglutarat. Prolina primar se oxidează în dihidroprolină, care, adiţionînd apa, se transformă în *γ-semialdehida acidului glutamic*. Ultimul compus se oxidează în glutamat care prin pereaminare va forma α-cetoglutaratul.

Sunt descrise două afecţiuni genetice ce sunt însoţite de hiperprolinemie (se moştenesc după tipul autozomal recesiv şi 50% din ele sunt însoţite de retard mintal):

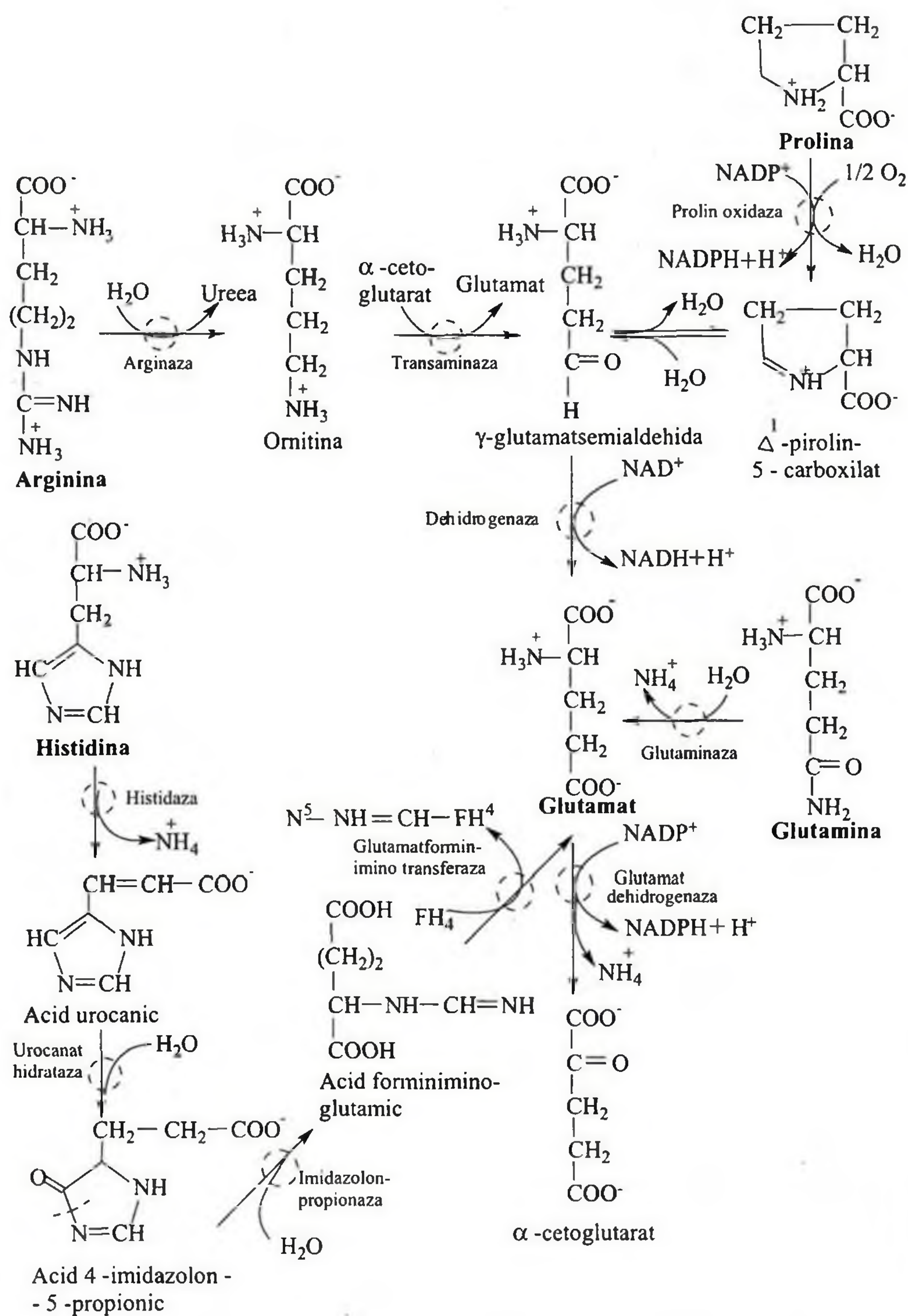


Figura 6.17. ***Catabolismul argininei, prolinei, histidinei, glutaminei şi acidului glutamic***

a) *Hiperprolinemie tip I* — în acest caz are loc un bloc metabolic la nivelul prolin dehidrogenazei. Nu sunt observate tulburări în catabolismul hidroxiprolinei. Afecţiunea decurge într-o formă uşoară, fără consecinţe grave pentru sănătatea individului.

b) *Hiperprolinemia tip II.* Se constată un grad mai major de hiperprolinemie decît în tip I. Urina conţine Δ-prolin-3-hidroxi-5-carboxilat. În acest caz e blocată dehidrogenaza ce catalizează oxidarea γ-semialdehidei acidului glutamic în glutamat Deoarece aceeaşi dehidrogenază funcţionează şi în catabolismul hidroxiprolinei (vezi fig.6.17a), catalizînd oxidarea γ-hidroxi-γ-semialdehid-L-glutamat în eritro-γ-hidroxi-L-glutamat, se dereglează nu numai catabolismul prolinei, dar şi a oxiprolinei. La heterozigoţi de tipul II, comparativ cu heterozigoţii tip I, nu se depistează hiperprolinemia.

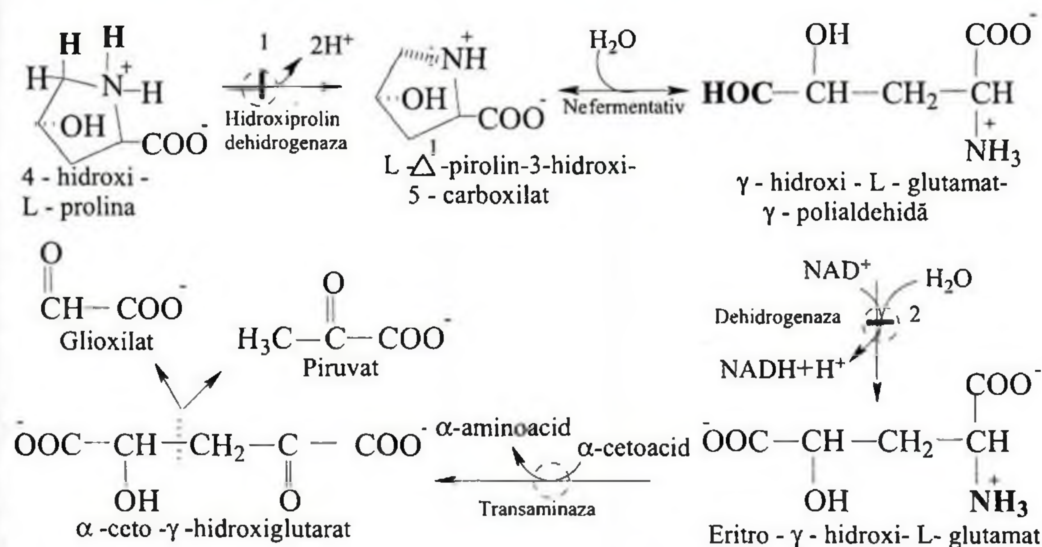


Figura 6.17a. ***Intermediatele catabolismului α-hidroxiprolinei în ţesuturile mamiferelor. Cifrele 1 şi 2 indică locul patologiilor metabolice: 1 - hiperhidroxiprolinemie tip I şi 2 - hiperprolinemie tip II***

Metabolismul histidinei (12)

Prin dezaminare, va forma *urocanatul.* Transformarea urocanatului în 4-imidazolon-5-propionat, catalizată de *urocanază,* include adiţia apei şi modificări intramoleculare de oxido-reducere. În calea formării α-cetoglutaratului are loc hidroliza, cu generarea N-formimin-glutamatului. În continuare, grupa formiminică este transferată pe α-C al FH_4, cu formarea glutamatului şi *N^5-formimin-tetrahidrofolatului.* La pacienţii cu deficit de acid folic ultima reacţie parţial se blochează şi N-formimin-glutamatul se excretă cu urina. Aceasta stă la baza testului de depistare a insuficienţei de acid folic (la încărcarea cu histidină în urină se depistează N-formimin-glutamatul).

O afecţiune autozomal recesivă e determinată de *diminuarea activităţii enzimei histidazei.* Bolnavii suferă de defecte ale vorbirii, au retard mintal pronunţat. În sînge şi urină se depistează concomitent cu nivelul înalt de histidină şi imidazol piruvat, (reacţia pozitivă cu clorura de fier poate da şi fenilpiruvatul, greşit considerat ca fenilcetonurie). Insufucienţa histidazei în ficat diminuează transformarea histidinei în urocanat şi stimulează

calea alternativă de metabolizare — histidina este transformată în *imidazol-piruvat*, surplusul acestui produs este excretat în urină. În urină se depistează şi derivaţii imidazol - piruvatului— *imidazol-acetat* şi *imidazol-lactat*.

În condiţii fiziologice, nivelul histidinei în urină e uşor apreciabil la valori majore. Majorarea acestui aminoacid e un test la o graviditate normală sau cînd este asociată cu hipertonie (valori şi mai mari). Testul nu depistează patologie în graviditate, dar confirmă unele modificări funcţionale renale. În graviditate creşte excreţia şi altor aminoacizi.

Metabolismul aminoacizilor ramificaţi. *Metabolismul leucinei(13), valinei(14), izoleucinei(15)*

Avînd o structură asemănătoare, catabolismul aminoacizilor respectivi suferă aceleaşi modificări: transaminare, decarboxilare oxidativă şi dehidrogenare. Apoi căile se ramifică cu particularităţile sale şi formarea intermediatelor amfibolice de natură glicogenică (valina) sau cetogenică (leucina), fie de ambele tipuri (izoleucina) (fig.6.18).

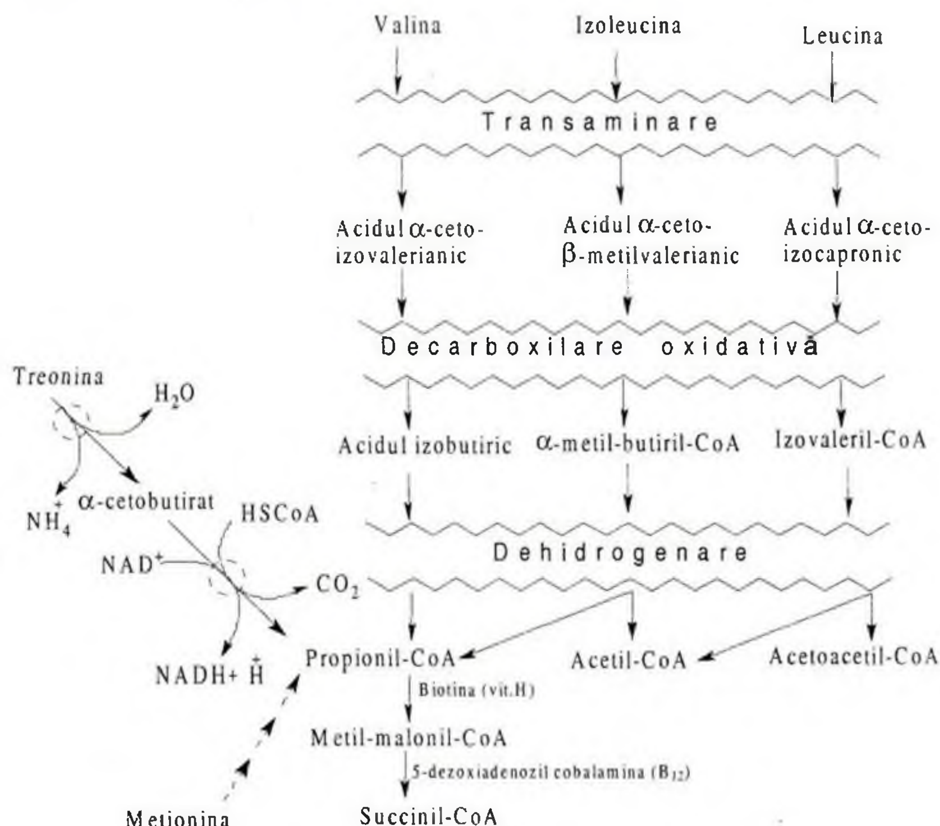


Figura 6.18. ***Catabolismul valinei, leucinei şi izoleucinei***

Leucina, printr-o secvenţă mult mai complicată de reacţii, se va scinda în acetil-CoA

şi acetoacetat. În procesul de degradare se includ: vit. B_6, B_1, B_2, PP, acidul lipoic şi biotina.

Sunt cunoscute unele tulburări metabolice în catabolismul acestor aminoacizi:

A. Mai bine studiată este *leucinoza — afecţiunea urinei cu miros de sirop de arţar*. În sînge şi urină se majorează cantitatea acestor aminoacizi, cît şi a α-cetoacizilor respectivi (urina capătă un miros specific). Pot fi depistaţi în urină şi α-hidroxiacizii corespunzători.

Simptomele specifice apar la sfîrşitul primei săptămîni după naştere: vomă, dificultăţi în alimentarea copilului, letargie, manifestări neurologice acute sau cronice. Diagnoza se confirmă la o analiză enzimatică. Fără tratament — *cazus letalis* în primul an de viaţă.

Baza biochimică constă în absenţa sau insuficienţa activităţii decarboxilazei α-cetoacizilor ce catalizează transformările lor în tioesterii acil-CoA, cu eliminarea CO_2. Copiii sunt alimentaţi cu amestec de aminoacizi ce nu conţin leucină, valină şi izoleucină. După normalizarea nivelului respectiv în sînge, se poate de inclus în dietă în cantităţi minime pentru asigurarea necesităţii stricte.

B. *Hipervalinemia* — afecţiune metabolică ce se caracterizează prin majorarea conţinutului valinei în sînge, determinată de dereglările transaminării valinei, cu formarea acidului α-ceto-izovalerianic. Dereglări în transaminarea leucinei şi izoleucinei nu se depistează.

C. *Cetonuria intermitentă* e o variantă a maladiei urinei cu miros de arţar şi e cauzată de tulburări mai minore în funcţia decarboxilazei α-cetoacizilor respectivi. Bolnavii posedă o capacitate minimă de catabolizare a valinei, leucinei şi izoleucinei. Simptome clinice caracteristice afecţiunii respective se manifestă mai tîrziu şi, de obicei, episodic. Pronosticul e favorabil la o dietă corijată.

D. *Acidemia izovalerianică*. Simptomele maladiei sunt mirosul de brînză (caşcaval) în aerul expirat şi în lichidele organismului, vomă, acidoză şi comă. Ultima e consecinţa utilizării proteinelor în cantităţi majore sau a prezenţei unei maladii infecţioase. Se observă episodic şi fenomene de retard mintal. Cauza maladiei e insuficienţa izovaleril-CoA dehidrogenazei. Izovaleril-CoA acumulat se hidrolizează şi izovaleriatul format se elimină prin urină şi sudoare.

Metabolizarea fenilalaninei(17) şi tirozinei(18)

Fenilalanina, fiind un aminoacid indispensabil pentru om, şi nu tirozina, care se sintetizează din primul, are o implicare metabolică în pigmenţi şi hormoni, şi mai ales în originea unor maladii congenitale, cauzate de tulburările de catabolism.

Catabolismul normal al fenilalaninei şi tirozinei decurge în modul cum e arătat în fig.6.19.

Fenilalanina se hidroxilează în tirozină, reacţie ce decurge ireversibil şi care explică necesităţile fenilalaninei, care pot fi atenuate prin administrare de tirozină. În reacţie participă o moleculă de oxigen: un atom se încorporează în substrat, altul este redus la apă, cu participarea tetrahidrobiopterina (THBP), care se oxigenează la DHBP (dihidrobiopterina, redus la iniţial prin intermediul lui NADPH). Tirozina pierde, în continuare, grupa sa aminică prin transaminare şi formează acidul p-hidroxifenil piruvic, care este oxidat în guinol. După transpoziţie, o decarboxilare oxidativă va conduce la *alcapton (acidul homogentizinic)*, care normal este catabolizat (prin intermediul a mai

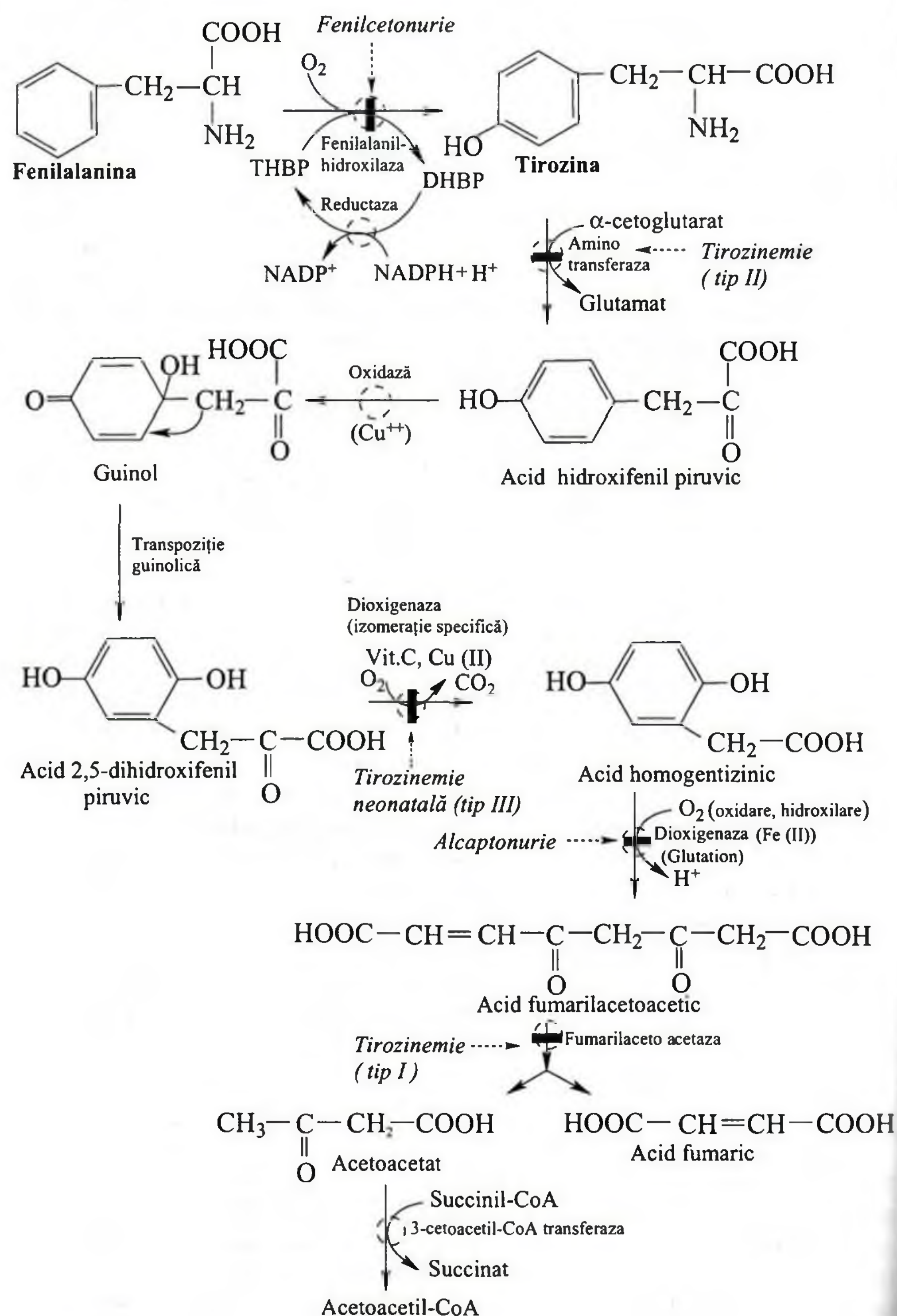


Figura 6.19. ***Degradarea fenilalaninei şi tirozinei***

multor reacții) parțial în acid fumaric, care, încorporîndu-se în ciclul Krebs, va favoriza sinteza glucozei prin gluconeogeneză (de aceea ambii aminoacizi posedă caracter gluco-formator), şi parțial în acid acetoacetic (ce le conferă caracter ceto-formator).

Tulburările de catabolism ale fenilalaninei şi tirozinei

Tulburările grave în catabolismul tirozinei pot duce la *tirozinemie, tirozinurie* şi *fenolacidurie*.

A. *Tirozinemia tip I (tirozinoza)* — enzimele defectate sunt fumarilaceto acetaza şi maleilaceto acetaza, avînd în consecință acumularea metaboliților respectivi. Forma acută e caracteristică pentru vîrsta fragedă şi este însoțită de vomă, diaree, deficiențe de creştere. Fără tratament, duce la exitus în vîrstă de 6-8 luni, cauzat de insuficiența ficatului.

Forma cronică se caracterizează prin aceleaşi simptome, dar mai puțin pronunțate şi va induce moartea la vîrsta de 10 ani. Se constată cantități majore de tirozină în sînge (6-12 mg/100mL). Sunt depistate şi majorări ale cantității de alți aminoacizi, îndeosebi a metioninei. Dieta cu cantități minore de tirozină, fenilalanină şi metionină ameliorează evoluția maladiei.

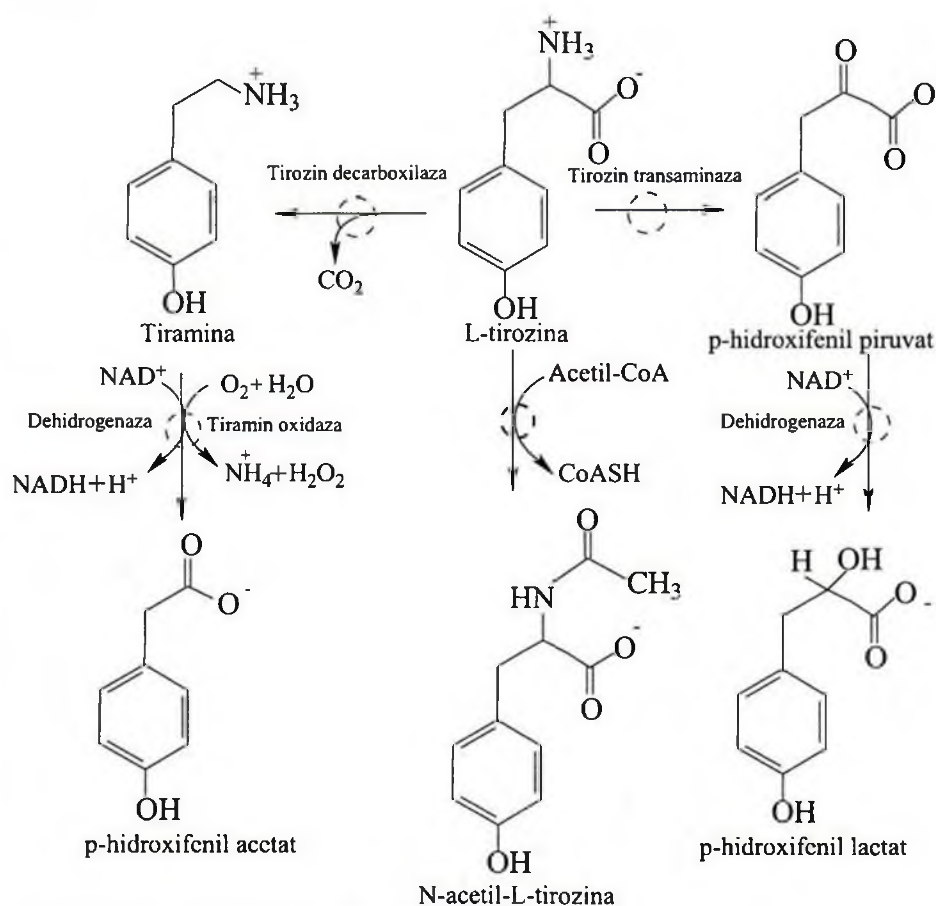
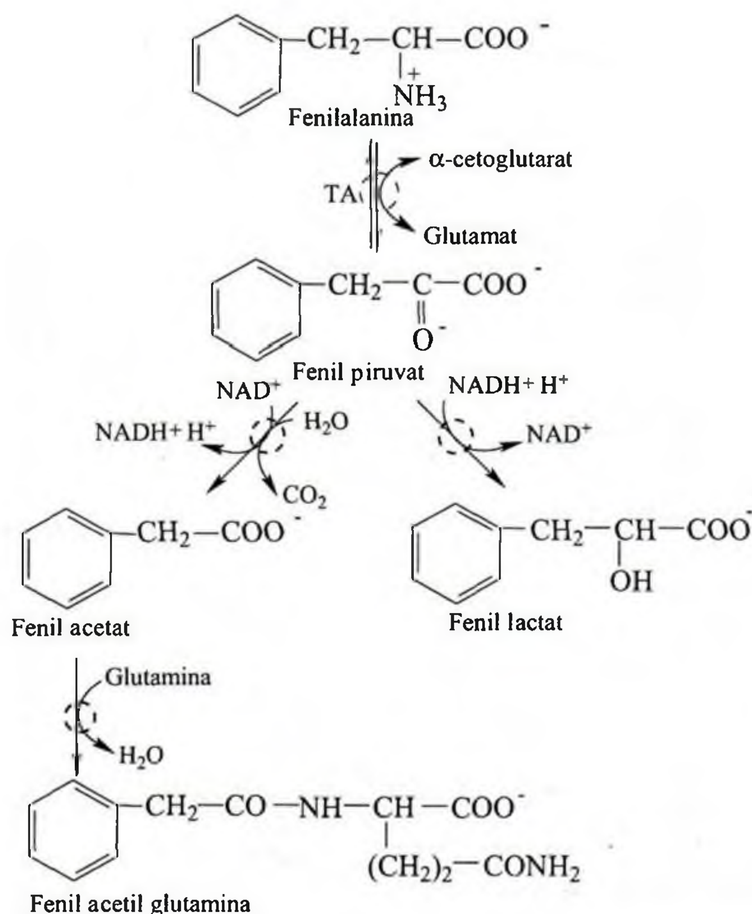


Figura 6.20. ***Cataboliții alternativi ai tirozinei***

B. *Tirozinemia tip II (sindromul Rihnera-Hanharta)* — enzima defectată e tirozin transaminaza ficatului. Se depistează cantități majore de tirozină în sînge (4-5 mg/100mL), afecțiuni caracteristice ochiului și pielei, retard mintal moderat, dereglarea coordonării mișcărilor fine. Filtrarea și reabsorbția tirozinei nu sunt dereglate. Printre metaboliții excretați se depistează p-hidroxifenil piruvat-lactat, -acetat, N-acetil tirozina și tiramina.(fig.6.20).

C. *Tirozinemia neonatală* e cauzată de insuficiența enzimei p-hidroxifenil piruvat hidroxilazei. Sunt depistate în sînge valori mari ale tirozinei și fenilalaninei, în urină - tirozina, tiramina, N-acetil tirozina, p-hidroxifenil acetat. În tratament — dietă cu reducere de proteine.

Deficiența sistemului enzimatic de hidroxilare a Phe determină apariția unei maladii metabolice, *fenilcetonuria clasică* (tip I). Sunt descrise și alte patologii ca: insuficiența dihidrobiopterin reductazei (tip II și III) și dereglări ale biosintezei dihidrobiopterinei (tip IV și V) — toate au în consecință blocarea transformării fenilalaninei în tirozină. Aproximativ 1,5% din totalul deficiențelor mintale revin acestei tulburări. Blocarea căii de transformare a Phe în tirozină conduce la acumularea Phe, care, prin transaminare, generează acid fenil piruvic. Acest acid, la rîndul său, prin decarboxilarea oxidativă formează acidul fenil acetic, iar prin dehidrogenare — fenil lactic, care se elimină prin urină.



Fenil acetatul în ficat este conjugat cu glutamina şi se elimină prin urină în formă de fenilacetil glutamină.

Prezenţa fenil piruvatului va fi determinată cu $FeCl_3$, rezultînd o culoare galben-verzuie, dar pentru confirmarea diagnosticului e necesară depistarea fenilalaninei în plasma sanguină. Copiii sunt alimentaţi prin utilizarea unei diete cu conţinut minim de fenilalanină. După vîrsta de 6 ani, dieta poate fi modificată, fiindcă la acest moment concentraţia fenilalaninei şi a derivaţilor ei nu mai posedă efect negativ asupra creierului. Pielea devine pală, părul - înălbit, se dereglează formarea *melaninei*, de faţă fiind demielinizarea nervilor. E inhibată şi hidroxilarea triptofanului, cu sinteza *serotoninei*. Urmează etapa importantă de despicare a nucleului aromatic, catalizată de dioxigenaza acidului homogentizic. În lipsa procesului, acidul dat se acumulează în ţesuturi. Urina eliminată se înnegreşte la aer, dată fiind oxidarea *acidului homogentizinic*. Tulburarea metabolică descrisă încă în secolul XVIII e denumită *alcaptonurie* — de la alcapton — denumire atribuită substanţei ce cauzează înnegrirea urinei. Cu toate acestea, bolnavii supravieţuiesc cu bine. După 40 de ani, acumularea acidului homogentizinic în ţesuturile conjunctive provoacă dureri artritice.

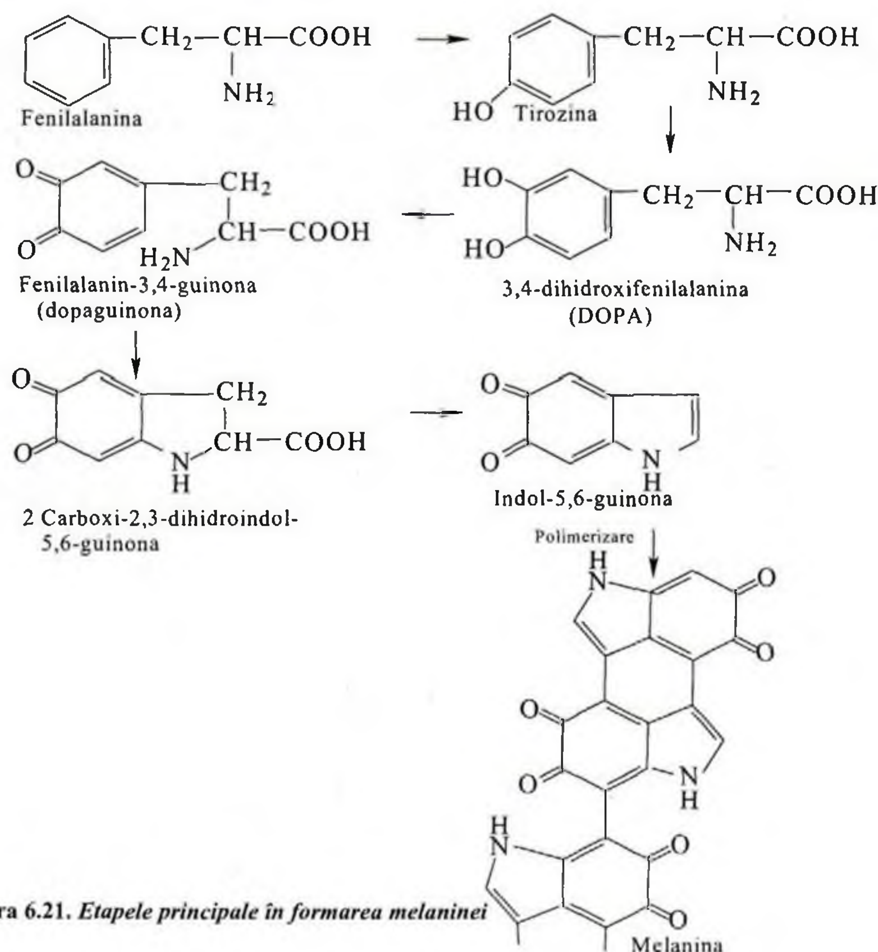


Figura 6.21. ***Etapele principale în formarea melaninei***

La oameni şi animale scorbutice se înregistrează o eliminare de acid p-hidroxifenil piruvic şi de acid p-hidroxifenil lactic. Administrarea de vit.C restabileşte catabolismul normal. Are loc, în acest caz, o inactivare a oxidazei şi e verosimil că acidul ascorbic exercită un efect de protecţie graţie proprietăţilor sale reducătoare şi evită inactivarea enzimei prin oxidare.

O altă maladie metabolică e *albinismul*, cauzată de deficienţa echipamentului enzimatic în organism necesar transformării tirozinei în melanină. Urmările — părul şi pielea se decolorează.

Blocajul poate avea loc în melanocite, unde se efectuează melanogeneza — deficienţa enzimei ce catalizează hidroxilarea tirozinei în DOPA sau o deficienţă la nivelurile posterioare după formarea *Dopei*, mai ales la nivelul polimerizării (fig.6.21).

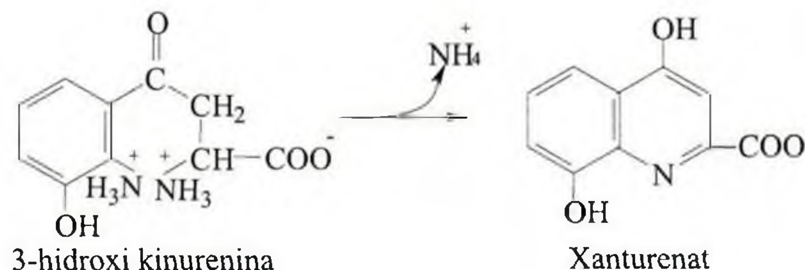
Fenilalanina şi tirozina, în aceeaşi măsură, sunt precursorii noradrenalinei şi adrenalinei. Tirozina este utilizată în sinteza hormonilor tiroidieni. Suita de reacţii va fi redată în capitolele respective.

Metabolismul triptofanului (19)

Triptofanul e unul din primii aminoacizi considerat esenţial. Izotopul radioactiv al triptofanului se depistează numai în proteine, dar o cantitate anumită se înregistrează şi în urină, în componenţa diferitor metaboliţi.

Triptofanul are un catabolism compus în ţesuturile animale. Calea majoră de degradare conduce la acetoacetil-CoA şi acetil-CoA. Triptofan pirolaza catalizează deschiderea inelului indol şi încadrarea a doi atomi de oxigen în formarea N-formil-kinureninei, fiind o metalo-proteină ce conţine fiero-porfirină. Sinteza enzimei are loc în ficat şi e indusă de triptofan şi adrenocorticosteroizi. O cotă majoră de enzimă sintetizată se află în formă latentă şi necesită o activare. Triptofanul stabilizează oxigenaza faţă de enzimele proteolitice. Enzima este inhibată şi de derivaţii acidului nicotinic, cît şi de NADPH (fig.6.22).

Eliminarea hidrolitică a grupei formil e catalizată de kinurenin formilaza, cu formarea L-kinureninei. Hidroxilarea ulterioară are loc cu participarea oxigenului molecular şi-i asigurată de un sistem de reacţii NADPH dependente. Atît kinurenina, cît şi hidroxi kinurenina este transformată în hidroxi antranilat, cu participarea kinureninazei, drept coenzimă servind vit.B_6. Insuficienţa vitaminei deregleză catabolismul acestor compuşi, formînd în ţesuturile extrahepatice xanturenatul, ce va apărea în urină. Surplusul de triptofan favorizează excreţia lui cu urina, de altfel, şi a compuşilor acidului nicotinic (N-metilnicotinamida). Vit.B_6 deregleză sinteza nucleotidelor pirimidinice (NAD^+ şi $NADP^+$).



Triptofan

Triptofan pirolaza, O_2

Formil kinurenina

THBP, $NADP^+$

O_2, Hidroxilază specifică, Reductază

H_2O, DHBP, $NADPH + H^+$

5-hidroxi triptofan

Decarboxilaza (Vit.B_6)

CO_2

Serotonina
(creier, intestin, plăcuțele sanguine)

H_2O, O_2, FAD

MAO

NH_3, $FADH_2$

Acid 5-hidroxi indol-acetic
(conjugat cu sulf și glucoronil, este excretat prin urină)

Formilaza, H_2O, HCOOH

Kinurenina

Hidroxilaza, $O_2 + NADPH + H^+$, Vit.B_6, $NADP^+ + H_2O$

Hidroxi kinurenina

Kinureninaza (Glutation), H_2O, Vit.B_6, Alanina

Acid hidroxi antranilic → Acetoacetil-CoA

Glutamina + PRPP + 2ATP

CO_2 + 2PPi + + ADP + Glutamat

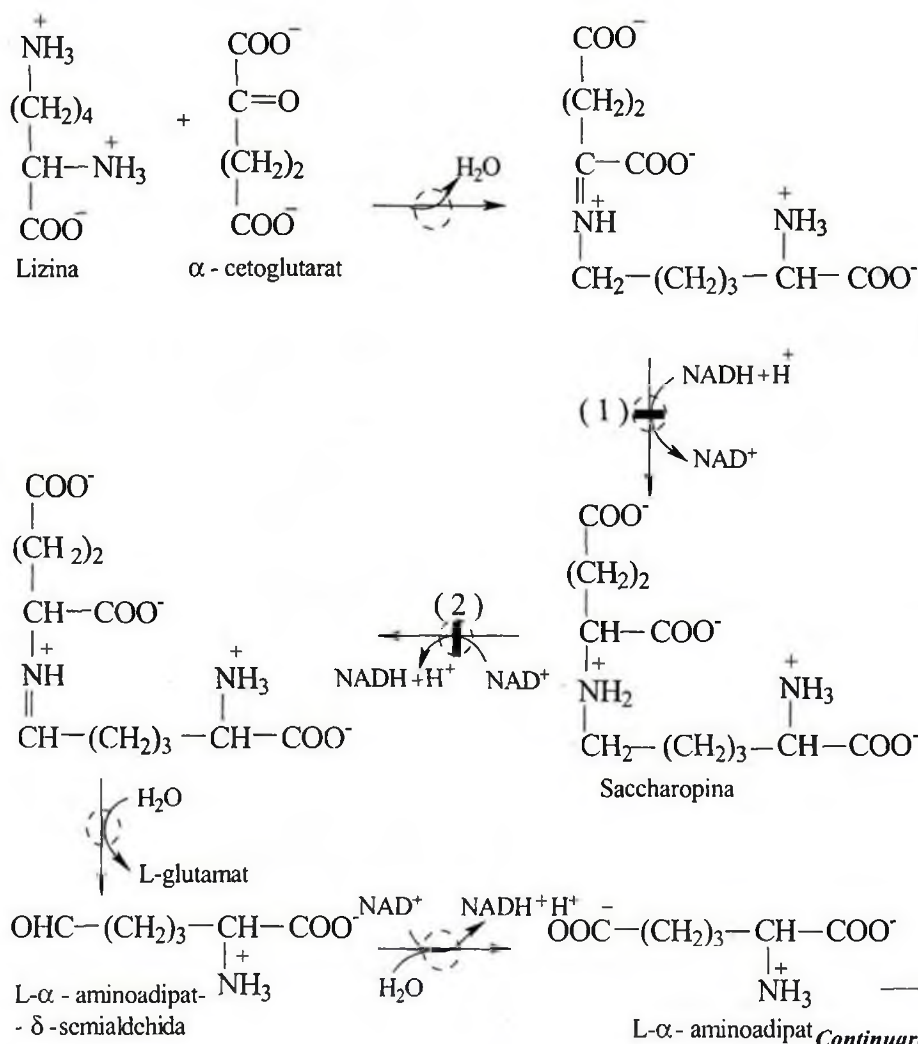
NAD^+ (vit. PP)

Figura 6.22. ***Catabolismul triptofanului***

Triptofan - pirolaza e o dioxigenază compusă din 4 subunităţi cu aceeaşi masă moleculară. Funcţionarea adecvată necesită Fe^{++}, Cu^{++}. Corticosteroizii amplifică activitatea, stimulînd sinteza mRNA specific. Insuficienţă enzimei TDOG provoacă *maladia Hartnup*, ce se caracterizează prin prezenţa unui retard mintal, ataxie cerebrală. În urină, se depistează cantităţi majore de triptofan şi indol-acetat. Foarte puţin Trp se transformă în formil kinurenină. Se amplifică excreţia excesivă a compuşilor indolici. În colon, triptofanul neabsorbit, sub influenţa enzimelor bacteriene, dă naştere acidului indol-acetic, fiind absorbit şi excretat. E posibilă substituirea parţială în raţia alimentară a vit. PP prin triptofan (60 mg.Trp ⟶ 1 mg NAD^+). Acidul hidroxi antranilic fiind oxidat, dezaminat, apoi redus şi decarboxilat, este transformat în acetoacetil-CoA (fig. 6.22).

Metabolismul lizinei (20)

Lizina prezintă unele particularităţi în catabolismul aminoacizilor: în prima fază nu are loc eliminarea α-aminogrupei prin transaminare.



Continuare pag.397

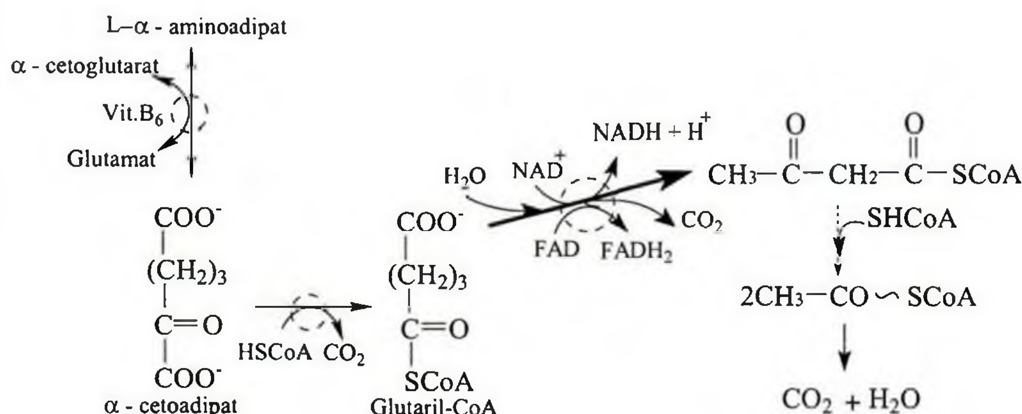


Figura 6.23. ***Catabolismul lizinei***

În țesuturile vertebratelor nici α-, nici ε-aminogrupe ale L-lizinei nu participă în așa tip de modificări. S-a constatat că lizina se condensează cu α-cetoglutaratul, cu eliberarea unei molecule de apă, formînd un compus Schiff. Apoi, o dehidrogenază îl reduce la saccharopină, iar alta — îl oxidează. Compusul format este hidrolitic scindat în L-glutamat și α-aminoadipat-γ-semialdehidă. Efectul sumar e echivalent cu eliminarea ε-aminogrupei lizinei prin transaminare.

În continuare, α-aminoadipatul este supus transaminării cu α-cetoglutarat, transformîndu-se în α-cetoadipat, apoi are loc o decarboxilare oxidativă, cu generarea glutaril-CoA (vezi fig.6.23).

Sunt descrise două dereglări metabolice în catabolismul lizinei și ambele sunt consecințe ale defectelor enzimelor ce realizează catabolismul pînă la acetoacetil-CoA. În ambele cazuri este blocată transformarea L-lizinei și α-cetoglutaratului în saccharopină.

În *hiperlizinemia periodică cu hiperamoniemie* (1) folosirea unei cantități normale de proteină duce la majorarea lizinei în țesuturi. Concomitent, apare și hiperamoniemia în consecința inhibării competitive a arginazei ficatului de lizină. Micșorarea conținutului de lizină în alimente și majorarea utilizării de lichid anihilează manifestările clinice. Încărcarea cu lizină are consecințe imprevizibile.

Hiperlizinemia persistentă fără hiperamoniemie (2) e cauzată de dereglările catabolizării saccharopinei în L-glutamat și α-aminoadipat-γ-semialdehidă. Tabloul clinic și biochimic variază mult.

Aminoacizii sunt utilizați și pentru sinteza compușilor ce îndeplinesc diferite funcții metabolice: aminele, oligopeptidele (glutation, carnozina —β-alanil histidina, anserina —β-alanil-N-metil-histidina, carnitina), sinteza purinelor, pirimidinelor, porfirinelor.

Sinteza creatinei

Acest proces se caracterizează prin fenomenul de pereamidinare și peremetilare (fig. 6.24).

Enzima *transamidinaza* transferă gruparea guanidinică. Transferul grupelor metil e catalizat de metiltransferaze. Cea mai mare parte de creatină se află în mușchii scheletali. În condițiile surplusului de ATP este fosforilată la *fosfocreatină*. Fosfocreati-

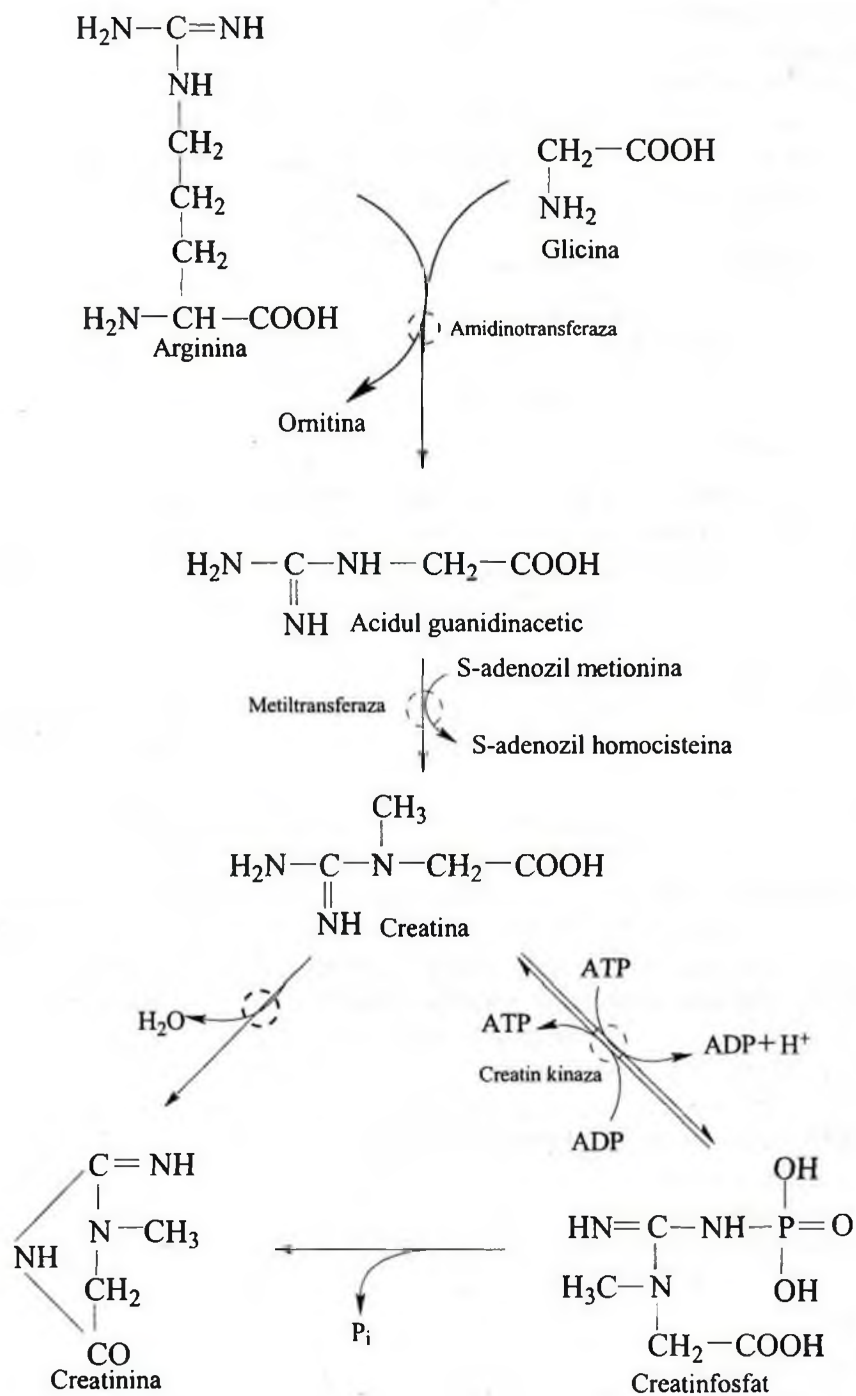


Figura 6.24. ***Sinteza creatinei***

na cedează cu uşurinţă ADP-ului restul de fosforil, rezultînd ATP, singură transformîndu-se în creatină.

În cazul solicitării prin conversia fosfocreatinei în creatină, se obţine momentan o anumită cantitate de ATP, pînă la intrarea în funcţie a glicolizei, cu fosforilarea oxidativă. Din creatină, prin anhidrizare, se obţine creatinina, formă de excreţie a acestui compus.

Cantitatea de creatinină depinde de masa musculară totală. E un component azotat al sîngelui, cel mai puţin variabil (0,7-1,2 mg/100mL). Cantitatea de creatinină excretată în 24 ore pentru 1kg greutate corporală este constantă la acelaşi individ şi se numeşte *coeficient de creatinină* (20-26 mg bărbaţi şi 14-22 mg femei).

Deficitul genetic al creatinei este cauzat de mutaţii la nivelul genelor implicate în biosinteza sau transportul creatinei. Afecţiunile se caracterizează prin retard neuromotor şi leziuni neurologice, cauzate de acumularea guanidino-acetatului. Administrarea de creatină ameliorează tabloul clinic.

Biosinteza aminoacizilor

Căile de biosinteză sunt foarte diverse şi toate posedă o proprietate comună primordială — scheletul carbonic al aminoacizilor îşi are originea din produsele intermediare ale glicolizei, ciclului pentozo-fosfaţilor şi ciclului Krebs. Situaţia se simplifică şi prin faptul că aminoacizii sunt devizaţi în şase familii biosintetice. Se ştie că organismul uman nu poate sintetiza opt aminoacizi (nutriţional indispensabili), iar alţi doi îi produce în cantităţi insuficiente (semiesenţiali). Aspectele generale se referă la: a) sursele atomilor de carbon; b) forma şi modul de interîncorporare a azotului.

Aminoacizii neesenţiali se sintetizeaza prin reacţii foarte simple. Sursa sigură de azot pentru biosinteza aminoacizilor o reprezintă amoniacul, la care grupările amino se realizează prin intermediul reacţiilor catalizate de glutamat dehidrogenază şi aminotransferaze. Deplasarea echilibrului reacţiilor catalizate de aceste enzime în sens catabolic sau anabolic se face atît prin concentraţiile compuşilor, cît şi prin acţiunea unor mecanisme de reglaj extrem de eficiente. Exemplu: NAD^+ este utilizat prioritar la eliberarea NH_3, în timp ce NADPH — la fixarea acestuia.

Din acidul glutamic, prin sistemul de reacţii de transaminare, gruparea NH_2 se transferă pe alte numeroase schelete de carbon.

Acidul glutamic + NAD^+ ($NADP^+$) + H_2O $\rightleftharpoons$ Acidul α-cetoglutaric + NH_3+ NADH (NADPH) + H^+

Enzima e glutamat dehidrogenaza.

1. Alanina cît şi alţi aminoacizi sunt sintetizaţi la o etapă:

Piruvat + Glutamat $\rightleftharpoons$ *Alanina* + α-cetoglutarat

2. Oxaloacetat + Glutamat $\underset{Vit.B_6}{\rightleftharpoons}$ *Aspartat* + α-cetoglutarat

3. Aspartat + NH_4^+ + ATP $\xrightarrow{H_2O}$ *Asparagina* + AMP + PP_i + H^+

La mamifere donator de NH_4^+ este glutamina.

4. Fenilalanina + O_2 + THBP $\longrightarrow$ *Tirozina* + H_2O + DHBP

Enzima este fenilalanin hidroxilaza, e o monooxigenază.

5.6. *Glutamat* şi *glutamina* se sintetizează prin α-cetoglutarat şi glutamin sintetază (GS):

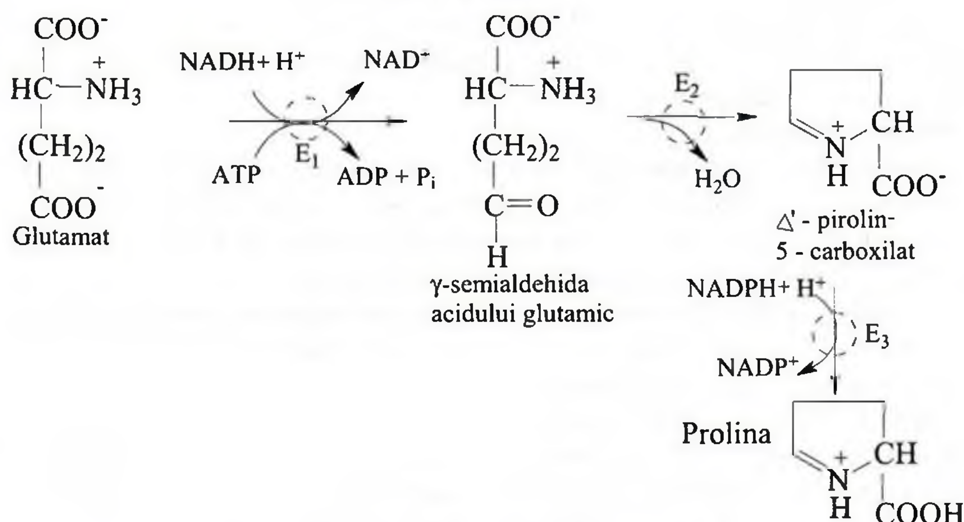


$$\alpha\text{-cetoglutarat} + NH_3 + NADPH\ (NADH) + H^+ \rightleftharpoons \textit{Glutamat} + NADP^+(NAD^+) + H_2O$$

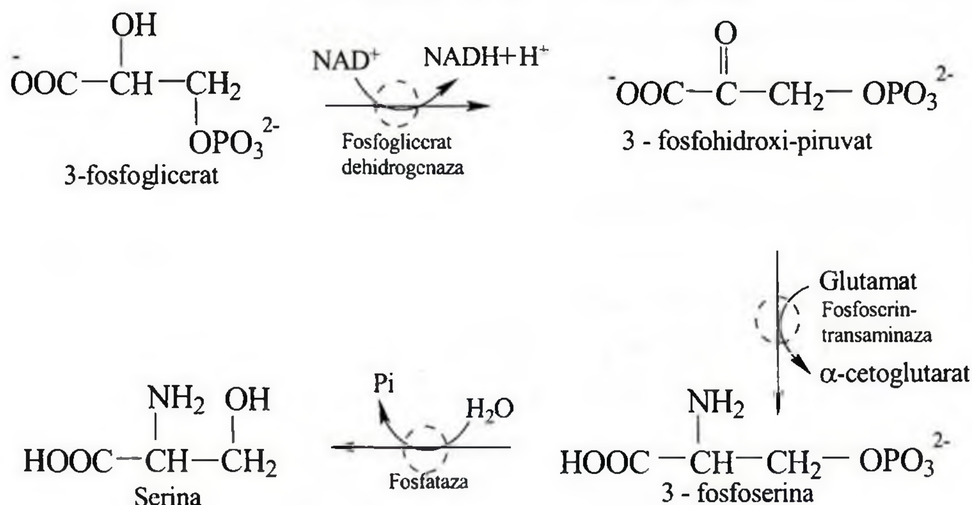


$$\textit{Glutamat} + NH_3 + ATP \xrightarrow{GS} \textit{Glutamina} + H_2O + ADP + P_i$$

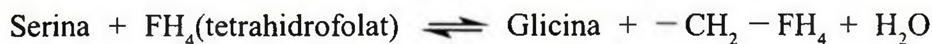
7. Glutamatul e precursor al *prolinei* — o cale, în sens invers, a celei degradative, cu foarte mici devieri: acţionînd cu ATP, formează în acil-fosfat, o anhidridă mixtă, ce se reduce la aldehidă - γ-semialdehida acidului glutamic, care se ciclizează, cu formarea acidului pirolin-Δ'-5-carboxilic şi apă, care ulterior trece în prolină.



8. *Serina* se sintetizează din 3-fosfoglicerat, produs intermediar al glicolizei.



9-10. *Serina* este un precursor al *glicinei*, *cisteinei* (fig. 6.26).



$$\text{Serina} + FH_4(\text{tetrahidrofolat}) \rightleftharpoons \text{Glicina} + -CH_2-FH_4 + H_2O$$

Enzima - serin-hidrooximetil transferază cu grupa prostetică vit.B_6

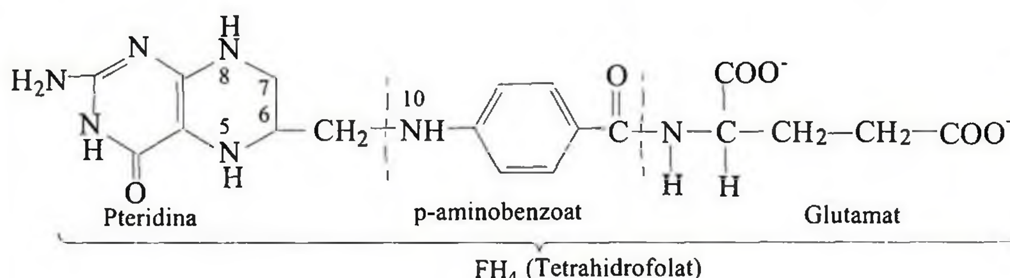
Glicina poate fi sintetizată şi în urma reacţiei:



$$CO_2 + NH_4^+ + -CH_2-FH_4 + NADH \rightleftharpoons \text{Glicina} + FH_4 + NAD^+$$

Reacţia este catalizată de glicin sintetaza.

Fragmentele monocarbonice. Un rol deosebit în metabolism îl are *tetrahidrofolatul* (FH_4).



Molecula e compusă din trei unităţi structurale: pteridina, p-aminobenzoatul şi glutamatul. Mamiferele nu sunt apte să sintetizeze inelul pteridinei. Îl acumulează din raţia alimentară sau din activitatea microorganismelor florei intestinale. Coenzima e transferator al fragmentelor monocarbonice (formimino, metil). Fragmentele sunt interdependente din punct de vedere metabolic, deoarece se modifică pe cale enzimatică, fiind catalizate de către o hidroximetil dehidrogenază în prezenţa $NADP^+$ ($-CH_3$, $=CH_2$, $-CH=$, $-CHO$, $-CH=NH$).

Formimin-glutamatul se formează în catabolismul histidinei, apoi grupa $-CHNH$ este transferată pe FH_4. Metabolismul fragmentelor monocarbonice şi utilizarea lor este redată mai jos (fig. 6.25).

Potenţialul de transfer al $-CH_3$ la FH_4 nu e semnificativ. De aceea, în biosinteză, donator al grupelor $-CH_3$ serveşte S-adenozil metionina, ce se sintetizează din metionină şi ATP. Gruparea CH_3 al metioninei se activează sub influenţa atomului de S cu sarcina pozitivă, ce îi conferă o capacitate de reactivitate mai pronunţată.

Transferul $-CH_3$ pe acceptor induce formarea S-adenozil homocisteinei, care se hidrolizează în homocisteină şi adenozină (fig.6.26).

Sinteza *cisteinei* (10) necesită homocisteina ca produs intermediar. Aceasta, condensîndu-se cu serina, formează cistationina. Cistationin sintetaza este o liază, avînd drept coenzimă piridoxalfosfatul (fig. 6.26).

Metionina poate fi regenerată prin transferul grupei $-CH_3$ de la $-CH_3-FH_4$. Reacţia e catalizată de *homocisteinmetil transferază* (HCT), intermediar fiind metil-cobalamida, coenzimă a HCT. Constituie a 2-a enzimă la mamifere, ce necesită vit. B_{12}.

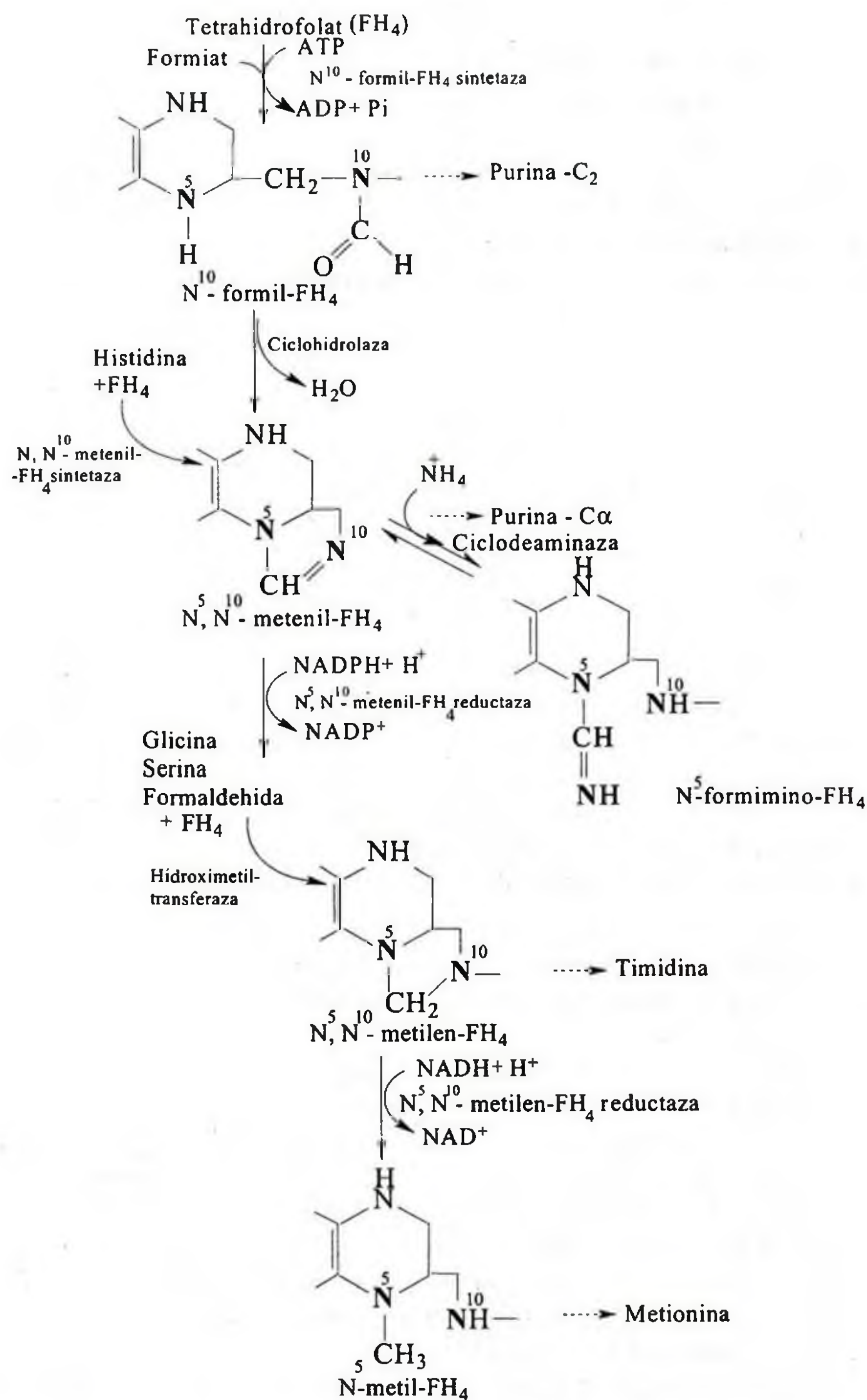


Figura. 6.25. ***Schema metabolismului fragmentelor monocarbonice***

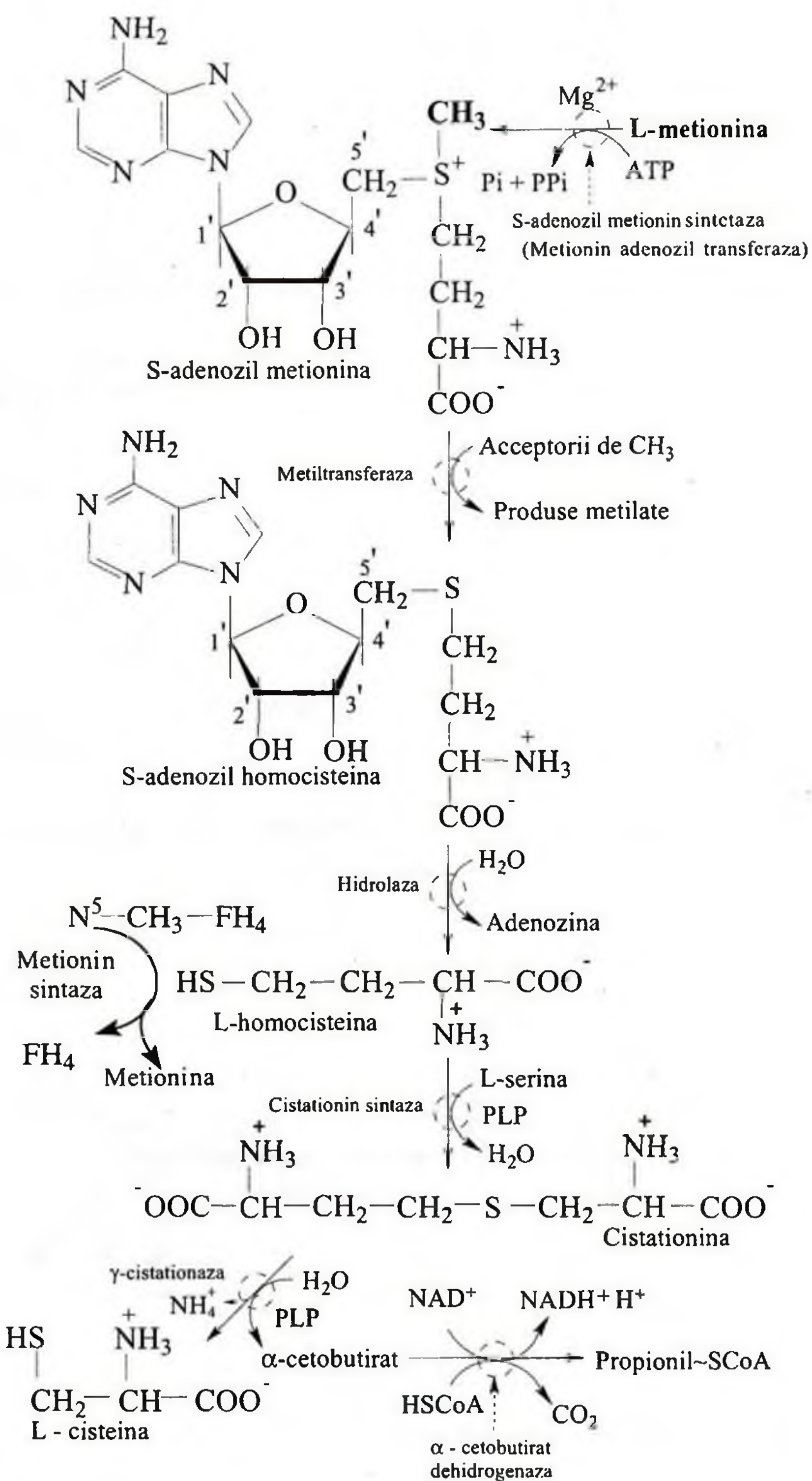
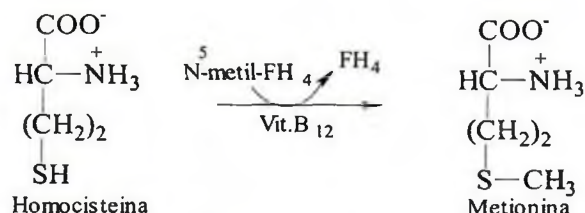
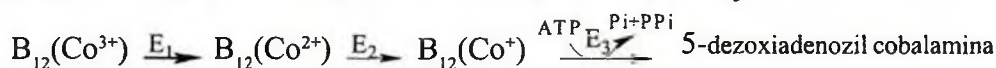


Figura 6.26. ***O cale de degradare a metioninei şi sinteză a cisteinei***



Enzimele cobalamidice catalizează reacții de 2 tipuri: de regrupare a atomilor şi de metilare. În mutază, drept coenzimă serveşte 5'-dezoxiadenozil cobalamina. Atomul de carbon ce donează hidrogenul său temporar e racordat la Co în B_{12} — atomul de Co are 6 legături (4 cu sistemul corinic). În poziția 5 — cu un derivat al dimetilbenzimidazolului. În poziția 6 - cu grupele — OH, dezoxiadenozil, — CN—, — CH_3 etc.



E_1 — flavoprotein reductaza; E_2 — reductaza - NADP dependentă; E_3 — transferaza.

Reglarea sintezei aminoacizilor. Viteza de sinteză a aminoacizilor e dependentă, în primul rînd de necesitățile de biosinteză, de cantitatea enzimelor şi de activitatea lor fermentativă. Etapa reglatoare decisivă e prima reacție ireversibilă. Produsul final de regulă inhibă enzima ce catalizează această reacție. Reglator-cheie al mecanismului ce dirijează torentul de azot e *glutamin sintetaza* (GS). Grupa amidică a glutaminei oferă o sursă de azot în biosinteza unor compuşi de vază (carbamoil fosfatul, triptofanul, histidina, GTP, AMP).

GS cumulativ este stopată de produse rezultante şi de alanină, glicină — reglare alosterică.(fig.6.27)

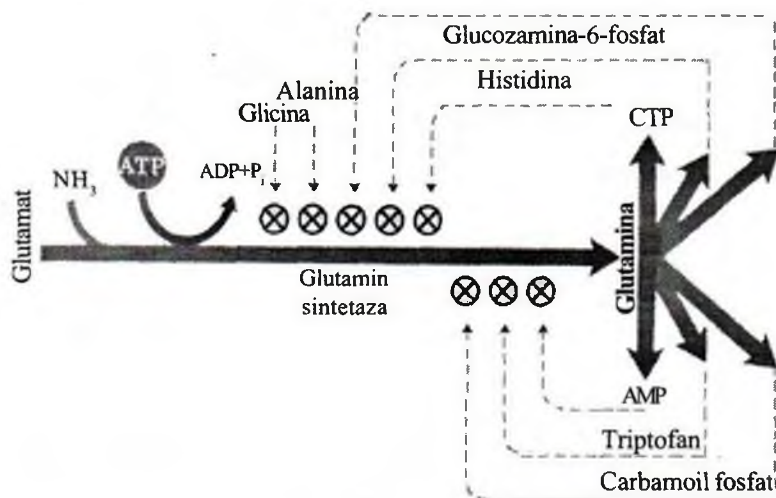


Figura 6.27. ***Reglarea alosterică a glutamin sintetazei***

Ei îi este proprie reglarea prin modificări covalente, adiționînd AMP la -OH a tirozinei din fiecare subunitate (în total 12).

Componentul adenilat este mai sensibil la inhibare decît cel neadenilat. Restul AMP este detaşat prin intermediul unei fosforilaze — reacţie catalizată de aceeaşi enzimă — adenilat transferaza. În ce constă fenomenul de adiţionare sau cedare a AMP? Această specificitate e controlată de o proteină reglatoare (P) ce există în două forme — Pa şi Pd: Pa cu AT (adenilat transferaza) — acest complex adiţionează AMP la GS, determinînd activitatea ei, pe cînd complexul Pd-AT detaşează AMP. Pa, la rîndul ei, este transformată în Pd prin adiţionarea UMP, reacţie catalizată de uridilat transferază, stimulată de ATP şi α-cetoglutarat şi frînată de glutamină. Restul UMP, adiţionat la Pd, este îndepărtat prin hidroliza fermentativă (fig. 6.28).

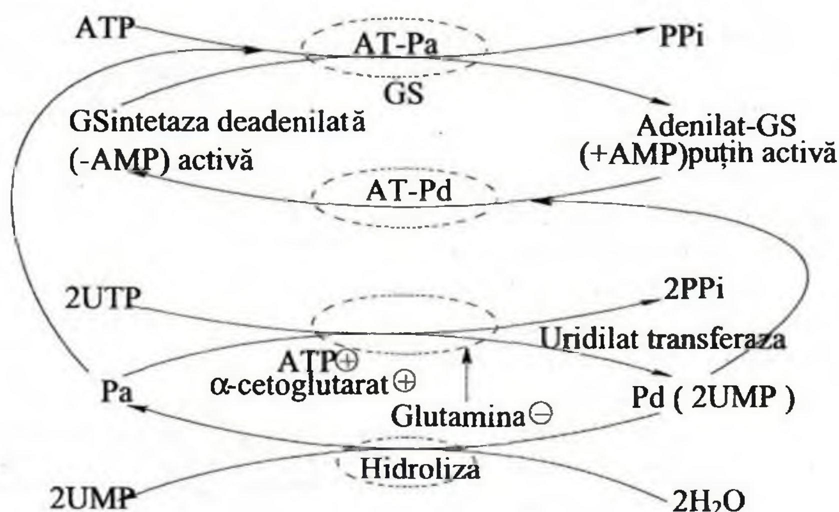


Figura 6.28. ***Reglarea covalentă a activităţii glutamin sintetazei***

Reglarea acestei enzime-cheie e supusă mecanismului de cascadă: pentru amplificarea semnalului şi majorarea esenţială a capacităţii de control alosteric ce permite de a regla auxiliar torentul de azot în celulă. Chiar şi o astfel de moleculă ca glutamin sintetaza, cu sensibilitatea şi posibilitatea ei nu poate recepta şi prelucra surplusul de semnale.

Metabolismul nucleotidelor

Digestia şi absorbţia nucleotidelor

Acizii nucleici, RNA şi DNA nutriţionali sunt supuşi modificărilor în tractul gastro-intestinal. *Ribonucleazele* şi *dezoxiribo-nucleazele* secretate de pancreas vor scinda polinucleotidele pînă la oligonucleotide. Fosfodiesterazele pancreatice vor conduce la formarea 3'- şi 5'-mononucleotide. În continuare, *nucleotidazele* vor hidroliza fosfatul, generînd nucleozide. Ultimele pot fi absorbite în celulele intestinale sau scindate de *nucleozidaze* la bazele respective. Purinele şi pirimidinele alimentare nu sunt utilizate în sinteza acizilor nucleici tisulari. Purinele în celulele mucoasei intestinale sunt transformate în acid uric, eliminat apoi din circulaţie prin urină. În metabolizarea bazelor purinice e implicată şi flora intestinală. Pirimidinele, riboza (dezoxiriboza) şi o parte din purine pătrund în circulaţia sanguină (fig.6.29).

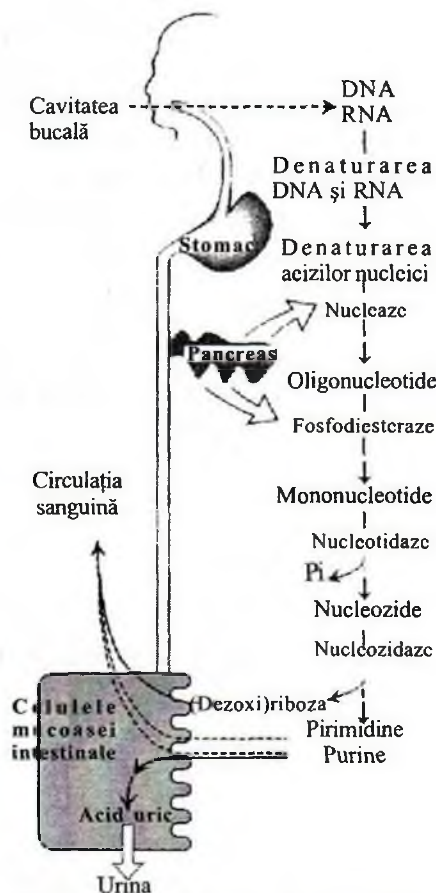


Figura 6.29. ***Digestia şi absorbţia nucleotidelor***

Metabolismul general al organismului trebuie să asigure existenţa unui fond, elucidînd cantitatea şi varietatea de nucleotide necesare pentru participarea la procesele esenţiale. Acest fond se realizează prin: sinteza de novo, interconversia nucleotidelor, conversia parţială a ribonucleotidelor în dezoxiribonucleotide.

Biosinteza de novo a nucleotidelor purinice

Inelul purinic are ca precursori mai multe substanţe (fig 6.30).

Utilizarea de precursori, marcaţi cu ^{15}N şi ^{14}C a stabilit originea fiecărui atom din acest nucleu. Prima reacţie constă în activarea ribozil-5-fosfatului cu ATP catalizată de *PRPP sintetază.* Produsul format 5-PR - α - 1-PPi este un compus-cheie în metabolismul nucleotidelor, fiind precursor şi la sinteza triptofanului şi histidinei (fig. 6.31).

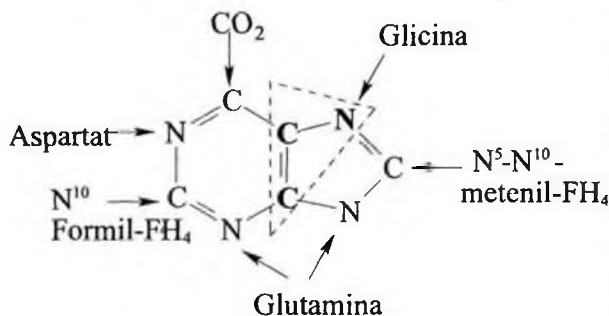


Figura 6.30. ***Sursa de atomi pentru inelul purinic***

Etapa-cheie în sinteză decurge în stadiul următor, finalizînd cu formarea 5-fosforibozil-aminei.

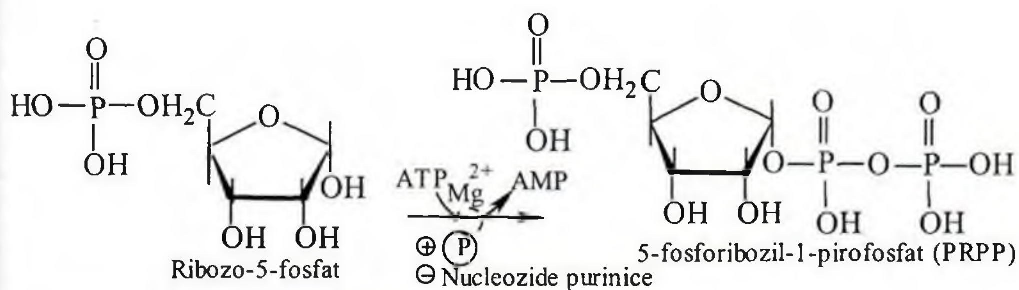
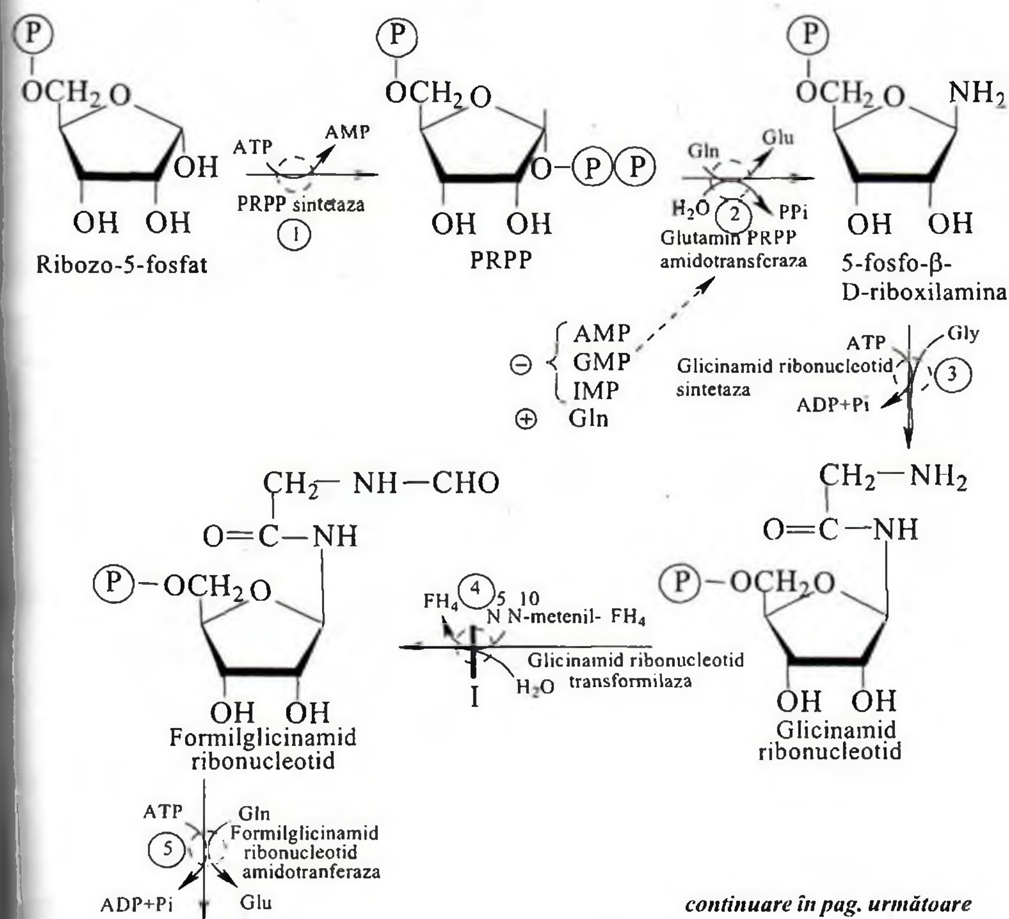


Figura 6.31. ***Sinteza PRPP și reglarea enzimei***

Enzima, amidofosforibozil-transferaza este al 2-lea punct de control al secvenței. Forța motrice a procesului este hidroliza pirofosfatului. *Glutamin amidotransferaza* poate fi inhibată de analogii structurali ai glutaminei ca: *azaserina* și *acivicina*, ultima este un agent chemoterapeutic în tratamentul cancerului (fig.6.32).

Urmează condensarea glicinei (ATP), metenil-FH_4, glutaminei (ATP), ATP, CO_2, aspartatul (ATP), formil-FH_4, cu sinteza acidului inozinic sau *inozinmonofosfat*. Sinteza necesită 6 P, ioni de Mg^{2+}, K^+, secvența este exergonică și ireversibilă (fig.6.32).



continuare în pag. următoare

Formilglicinamidin ribonucleotid

⑥ ATP → ADP+Pi
5-amidoimidazol ribonucleotid sintetaza

5-amidoimidazol ribonucleotid

⑦ CO_2
5-amidoimidazol ribonucleotid carboxilaza

5-amino-4-carboxiamino-imidazol ribonucleotid

⑧ Asp, ATP → ADP+Pi
N-succinil-5-aminoimidazol-4-carboxiamid ribonucleotid sintetaza

N-succinil-5-aminoimidazol-4-carboxiamid ribonucleotid

⑨ N-succinil-5-aminoimidazol-4-carboxiamid ribonucleotid liaza
Fumarat

5-aminoimidazol-4-carboxiamid ribonucleotid

⑩ I
N^{10}-formil-FH_4 → FH_4
5-aminoimidazol-4-carboxiamid ribonucleotid transformilaza

N-formilaminoimidazol-4-carboxiamid ribonucleotid

⑪ Inozin-5'-monofosfat sintaza
H_2O

Inozin-5'-monofosfat (IMP)

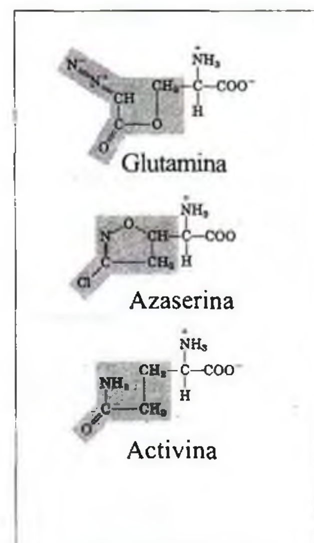


Figura 6.32. ***Biosinteza de novo a IMP***

Procesul de sinteză este modificat de acțiunea unor preparate medicamentoase cum sunt analogii *acidului p-aminobenzoic (APAB) şi acidului folic*. Sulfonamidele, analogi după structură cu APAB, competitiv inhibă sinteza de acid folic la bacterii. Întrucît sinteza purinelor necesită FH_4 în calitate de coenzimă, preparatele date reduc această cale în bacterii. În corpul omenesc acidul folic nu se sintetizează şi, deci, este nevoie de sursă externă. De aceea, sulfonamidele, nu împiedică sinteza purinelor la om.

Metotrexatul şi compuşii analogi inhibă reacția de reducere a dihidrofolatului în tetrafolat (vezi fig.6.32, etapele I). Ele limitează cantitatea de FH_4 necesar sintezei purinelor şi, astfel, diminuează replicarea DNA în celulele mamiferelor. Aceşti compuşi sunt utilizați în terapia cancerului care se dezvoltă rapid, însă sunt toxici pentru toate celulele care divizează. Analogii structurali ai purinelor (acicloguanozina-*aciclovir*) sunt folosiți în tratamentul infecțiilor herpetice. Aceşti antimetaboliți sunt fosforilați de enzimele celulare sau virale, rezultînd derivați activi, care blochează specific DNA-polimerazele virale.

IMP este, mai departe, convertit în AMP şi GMP conform schemei din figura 6.33. Consumarea diferitor surse de energie oferă posibilitatea controlului reciproc al sintezei nucleotidelor cu adenină şi guanină.

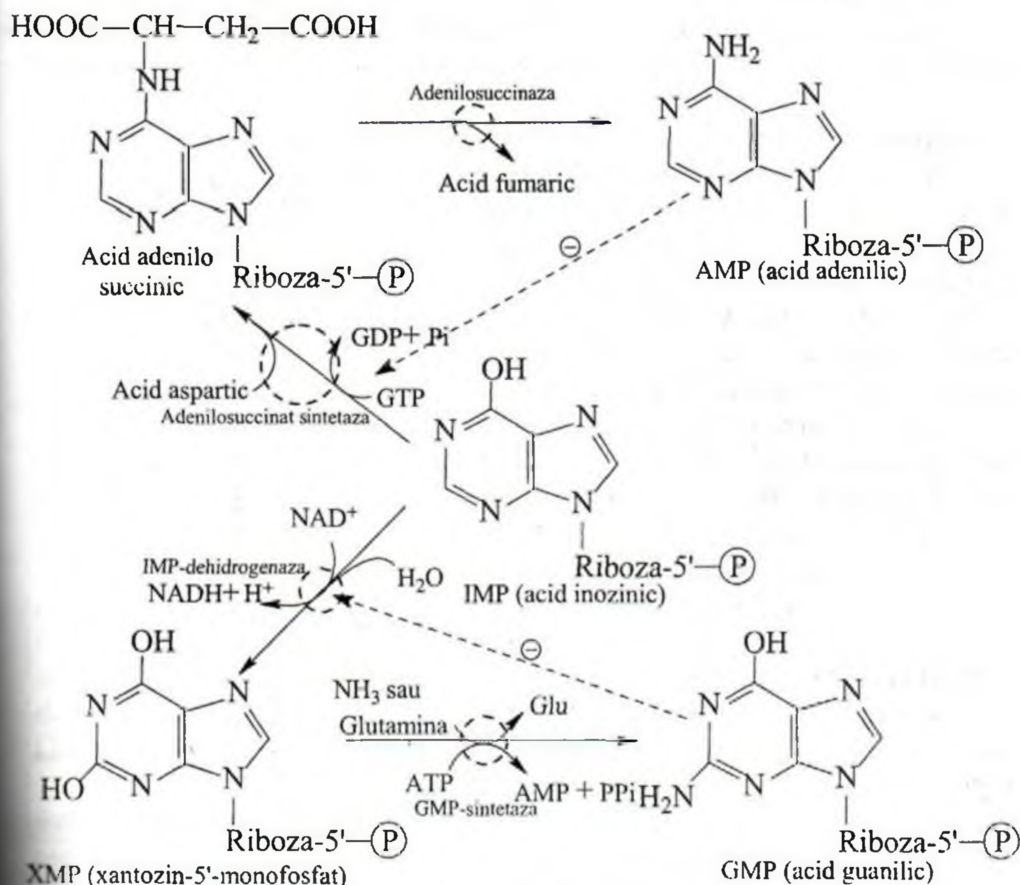
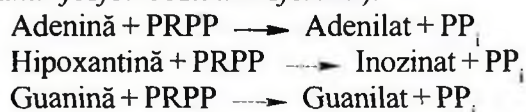


Figura 6.33. Conversia IMP în AMP şi GMP şi reglarea acestor reacții

Reutilizarea purinelor

La hidroliza acizilor nucleici, nucleozidelor se formează baze purinice libere, care pot fi utilizate pentru sinteză. Împreună cu cele sintetizate de novo, alcătuiesc un fond metabolic comun accesibil tuturor celulelor. Sinteza din produse finite (reîncorporarea, reutilizarea) este mai eficace, mai ieftină pentru celule, mai ales în celulele cu o mare viteză de creştere, de regenerare (embrionul, tumorile, reproducerea). La prima etapă are loc condensarea bazei purinice cu PRPP şi crearea directă a ribonucleotidului, reacţie catalizată de *fosforibozil transferaze*. Există o enzimă specifică pentru adenină (APRT) — *adenin-fosforibozil transferaza* şi alta pentru guanină şi hipoxantină (HGPRT-*hipoxantin-guanin-fosforibozil transferaza*).



Adenină + PRPP ⟶ Adenilat + PP_i

Hipoxantină + PRPP ⟶ Inozinat + PP_i

Guanină + PRPP ⟶ Guanilat + PP_i

O transformare la care sunt supuse purinele libere sau derivaţii lor este dezaminarea, prin care o funcţie NH_2 este înlocuită cu una oxigenată. Reacţia poate avea loc la nivel de nucleotid, nucleozid sau bază purinică. Dezaminarea AMP la IMP, sub acţiunea *AMP dezaminazei*, este calea cea mai probabilă de metabolizare a AMP.

Guanin dezaminaza (guanaza) transformă guanina ⟶ xantină, şi inozina ⟶ hipoxantină. La mamifere lipseşte enzima care transformă adenina în hipoxantină.

Reglarea biosintezei

Un mecanism asigură cantitatea de IMP şi altul — repartizarea lui între AMP şi GMP. Transformarea lor în trifosfaţi este dependentă de sarcina energetică celulară (fig.6.34).

Nucleotidele acţionează ca efectori negativi asupra — PRPP sintetazei, amidofosfo-ribozil transferazei, forma monomerică fiind activă, iar dimerică — inactivă. Creşterea concentraţiei PRPP provoacă depolimerizarea asociată, cu activarea enzimei. Nucleozidele acţionează în mod invers, drept activator serveşte glutamina. Aici se mai înregistrează un control pozitiv reciproc din partea ATP şi GTP.

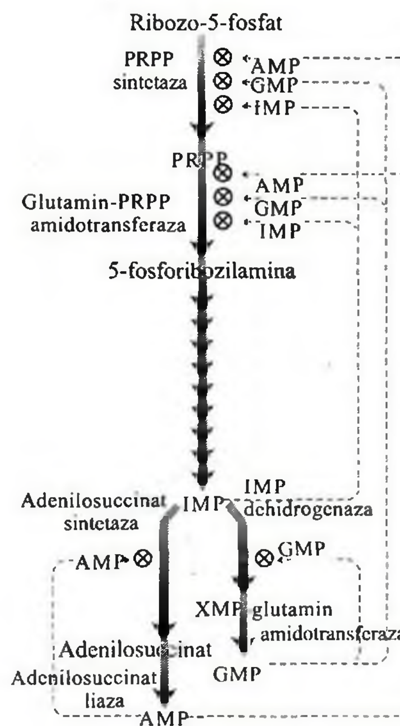
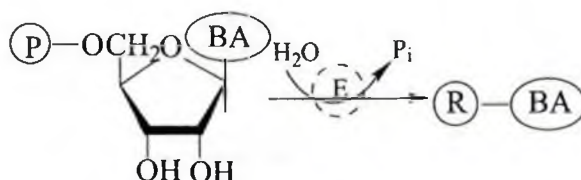


Figura 6.34. ***Reglarea biosintezei nucleotidelor purinice***

Catabolismul purinelor

Bazele purinice endogene sau exogene, care n-au fost încorporate în nucleotide, sunt transformate în acid uric şi eliminate pe cale renală.

Nucleotidele pot fi transformate în nucleozide prin hidroliză, catalizată de 5'-*nucleotidaze*.



Nucleozidele sunt scindate la baze printr-o reacție fosforolitică, catalizată de o nucleozid fosforilază (E_1), cu formarea R-1-P care poate fi izomerizat sub acțiunea fosforibozil mutazei (E_2) în R-5-P, substrat pentru sinteza PRPP.



Degradarea nucleotidelor pînă la produsele finale este redată în figura 6.35.

Acidul uric se formează din hipoxantină și din xantină prin oxidare, cu participarea *xantin oxidazei*. Enzima e o flavoproteidă dimeră, ce conține molibden și Fe^{++}.

Păsările și reptilele elimină acid uric, păstrînd apa în organism, deoarece cristalele lui se elimină cu o minimă cantitate de apă. Ureea leagă cantități mari de apă. Aceste specii ce elimină acidul uric sunt numite uricotelice față de ureotelice (elimină uree). Degradarea ulterioară a acidului uric este redată în fig.6.36.

Acidul uric este un compus greu solubil în apă, pe cînd monouratul de sodiu este ceva mai solubil. Pe masură ce procesul de acidifiere a urinei progresează, uratul trece în acid uric. La un pH = 5,75 uratul și acidul uric coexistă în cantități egale, iar la pH < 5 predomină acidul uric mai puțin solubil. În 24 ore excreția constituie 400-600 mg.

Acidul uric este o substanță ușor oxidabilă și, prin capacitatea sa de a capta radicali liberi, este un factor protector contra agresiunii oxidante continuie la care sunt expuse majoritatea țesuturilor organismului.

Patologia metabolismului purinelor

Sunt depistate unele patologii în catabolismul nucleotidelor.

Deficitul *adenozil deaminazei* cauzează imunodeficiență severă și combinată, ce conduce la disfuncția T și B-celulelor, creșterea enormă de dATP în eritrocite, ce este inhibitorul ribonucleozid reductazei și, respectiv, inhibă sinteza DNA. Copiii cu acest deficit, de obicei, decedează pînă la doi ani.

O altă patologie este deficitul de *purin nucleozid fosforilază* ce duce la disfuncția celulelor T fără efect vădit asupra funcției celulelor B. Scade sinteza de acid uric combinată cu creșterea nucleozidelor și nucleotidelor purinice. dGTP este nucleotidul major care se acumulează în eritrocite. El stimulează reducerea ADP la dADP care este convertit în dATP — inhibitor al ribonucleotid reductazei. De asemenea, dGTP inhibă reducerea UDP și CDP.

Guta este patologie ce se caracterizează prin hiperuricemie. Guta primară este o formă a bolii care apare în rezultatul unei erori înnăscute a metabolismului. *Hiperuricemia secundară* poate fi cauzată de alte maladii, cum ar fi cancerul, insuficiență renală cronică, stări hipercatabolice, traumatisme, radio-sau chimioterapie, infecții cronice, acidoza metabolică.

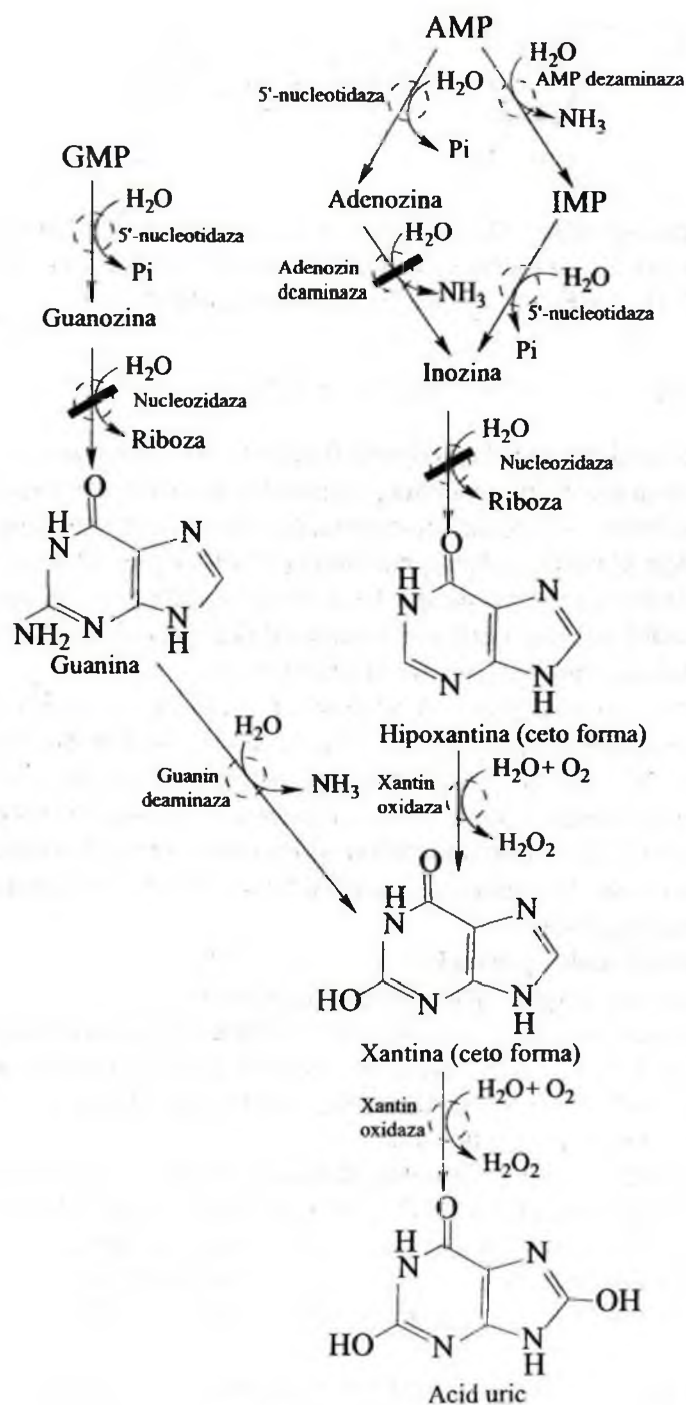


Figura 6.35. ***Degradarea nucleotidelor purinice. Defectele genetice și asociate cu această cale***

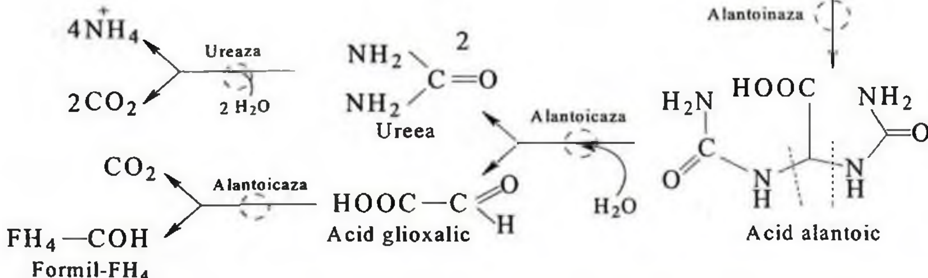
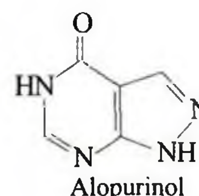


Figura 6.36. ***Catabolismul nucleotidelor purinice: formarea acidului uric şi degradarea ulterioară***

Hiperuricemia — cauza gutei, maladie manifestată clinic prin dureri artritice episodice sau cronice, nefrolitiază şi depozite de acid uric în ţesuturile moi. Creşterea concentraţiei uratului în sînge şi în lichidele interstiţiale, depăşirea pragului de solubilitate determină precipitarea uratului monosodic, apoi declanşarea reacţiei inflamatorii de cristale de urat, cu formarea calculilor la nivel renal. Suferă mai des bărbaţii. Mecanismele sunt complexe — este remarcată o diminuare a activităţii *hipoxantin - guanin - fosforibozil transferazei* — enzima ce catalizează sinteza IMP şi GMP din produse de rezervă. În consecinţă, are loc sporirea cantităţii de PRPP. La bolnavi se observă şi o activizare susţinută a *PRPP-sintetazei,* dată fiind dereglarea ei alosterică. Se măreşte conţinutul PRPP. Se instalează şi o deficienţă de *G-6-fosfatază*, ce împiedică eliberarea glucozei şi G-6-P, pompată pe calea pentozo-fosfaţilor cu producerea, în exces, a ribozo-5-P, materie primă pentru sinteza PRPP.

Hiperuricemiile sunt corectate prin administrarea de *alopurinol*—analog al hipoxantinei. *Alopurinolul*, fiind substrat pentru xantin oxidază, conduce la formarea aloxantinei care devine inhibitorul enzimei, fixat rigid în centrul ei activ, unde molibdenul rămîne +4 şi nu se reoxidează pîna la +6, ca în ciclul catalitic normal. Hipoxantina şi xantina sunt secretate drept cataboliţi finali ai purinelor şi, fiind mai solubile, nu se depun în ţesuturi.

Efectul inhibitor al alopurinolului e dependent şi de reacţia cu PRPP. O dată cu sinteza ribonucleotidelor, se micşorează concentraţia PRPP ce limitează sinteza purinelor de novo.



Alopurinolribonucleotidul format stopează transformarea PRPP în fosforibozilamină, sub acţiunea amido-PR-transferazei. În final, concentraţia acidului uric scade complet — formarea calculilor se stopează.

Lipsa completă a hipoxantin-guanin-fosforibozil transferazei (HGPRT) are consecinţe nefaste pentru funcţionarea organismului — se pierde capacitatea de reutilizare a bazelor purinice. Ca urmare, creşte concentraţia PRPP şi ritmul sintezei de novo (fig 6.37).

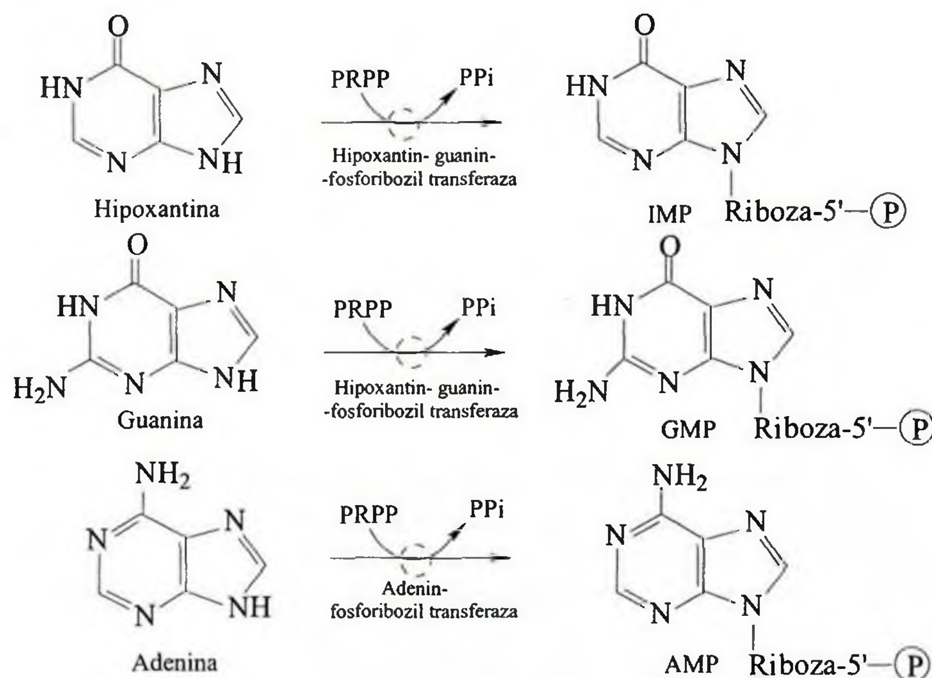


Figura 6.37. ***Căile de sinteză a nucleotidelor purinice***

Gena defectă e situată pe cromozomul X şi deficitul se manifestă numai la bărbaţi. Creşterea concentraţiei de acid uric iniţial conduce la formarea calculilor — *sindromul Lesch-Nyhan*, la care copiii au tendinţa de a-şi distruge corpul, suferă de insuficienţă mintală, convulsii. Creierul, posibil, e foarte dependent de sinteza purinelor din produsele finite. În condiţii normale, activitatea HGPRT în creier este mai intensă, pe cînd activitatea amidotransferazei e mai redusă. În organismul acestor bolnavi alopurinolul nu se transformă în ribonucleotid şi nu micşorează concentraţia de PRPP. Sinteza de novo nu e inhibată. Concentraţia acidului uric efectiv scade după alopurinol. Toate acestea confirmă: calea de sinteză a nucleotidelor din produse finite nu e un lux pentru organism, dar o necesitate deocamdată puţin identificată.

Metabolismul nucleotidelor pirimidinice

Bazele pirimidinice sunt sintetizate din precursori simpli, aminoacizi şi CO_2. Aici primordial se formează inelul, apoi adiția fosforibozilului, cu crearea pirimidin-nucleotidei. Donator e acelaşi compus PRPP. Biosinteza de novo este inhibată atît de nucleotide pirimidinice, cît şi de cele purinice. La pirimidine funcționează mecanisme eficiente de reutilizare a nucleozidelor, dar nu a bazelor.

Biosinteza de novo

Primul metabolit — *carbamoil-fosfatul* — este comun şi pentru ureogeneza ce se sintetizează în mitocondrii, în cazul pirimidinelor — în citozol. Enzimele utilizează surse diferite de azot - NH_3— ureogeneza şi glutamina — în pirimidinogeneză. Enzimele sunt distincte (2-carbamoil-fosfat sintetaze). Consecutivitatea reacțiilor e reprodusă în fig. 6.38.

Reacția-cheie e catalizată de *aspartat transcarbamoilază* cu sinteza N-carbamoil-aspartat, apoi are loc ciclizarea lui, cu eliminarea H_2O. Enzima dihidroorotaza catalizează formarea acidului dihidroorotic, după care *dehidrogenaza NADd* formează acidul orotic. Transferul restului P-ribozil de la PRPP, grație unei transferaze succedată de decarboxilarea acidului orotidilic, finalizează ciclul de reacții, formîndu-se UMP.

Enzimele 1-3 şi 5-6 au o localizare citozolică şi numai E_4 — mitocondrială. Enzimele citozolice formează 2 complexe multienzimatice. Primul complex duce la sinteza (1-3) acidului dihidroorotic, care difuzează în mitocondrii, unde este dehidrogenat de E_4 (pe membrana internă), apoi produsul trece în citozol, unde este supus acțiunii complexului multienzimatic următor (5-6). Enzimele în complexe se sintetizează în cantități echimolare. La deficiență de *OMP-decarboxilază* şi *orotat-fosfo-ribozil transferaza*, care prezintă domenii separate ale aceluiaşi polipeptid, apare *orotataciduria*. Boala debutează timpuriu şi se caracterizează prin creşterea anormală, anemie megaloblastică şi excreție excesivă de orotat în urină. Dieta bogată în uridină ameliorează anemia şi diminuează eliminarea orotatului. Administrarea uridinei, a citidinei care sunt convertite în derivații respectivi reia diviziunea celulară şi ameliorează situația. UTP sintetizat stopează sinteza acidului orotic (efect inhibitor asupra carbomoil-fosfat sintetazei).

De la UMP, prin fosforilare, se obțin celelalte nucleotide pirimidinice grație enzimelor E_1-nucleozidmonofosfo kinaza şi E_2-nucleoziddifosfo kinaza:



CTP se obține din UTP conform reacției:



$$UTP + Glutamina + ATP + H_2O \longrightarrow CTP + Glutamat + ADP + P_i + 2H^+$$

Enzima ce catalizează această reacție e CTP-sintetază.

Sinteza dezoxiribonucleotidelor are loc prin reducerea ribonucleotidelor la 2' a difosfaților. Electronii sunt transferați pe substrat prin SH grupe. Tioredoxina reprezintă o proteină mică. Enzima - *tioredoxin reductaza* - e o flavoproteină ce reduce tioredoxina. Enzima — *ribonucleotid reductaza*, pentru activitate, necesită vit. B_1, vit. B_2, Mg^{2+} (fig.6.39).

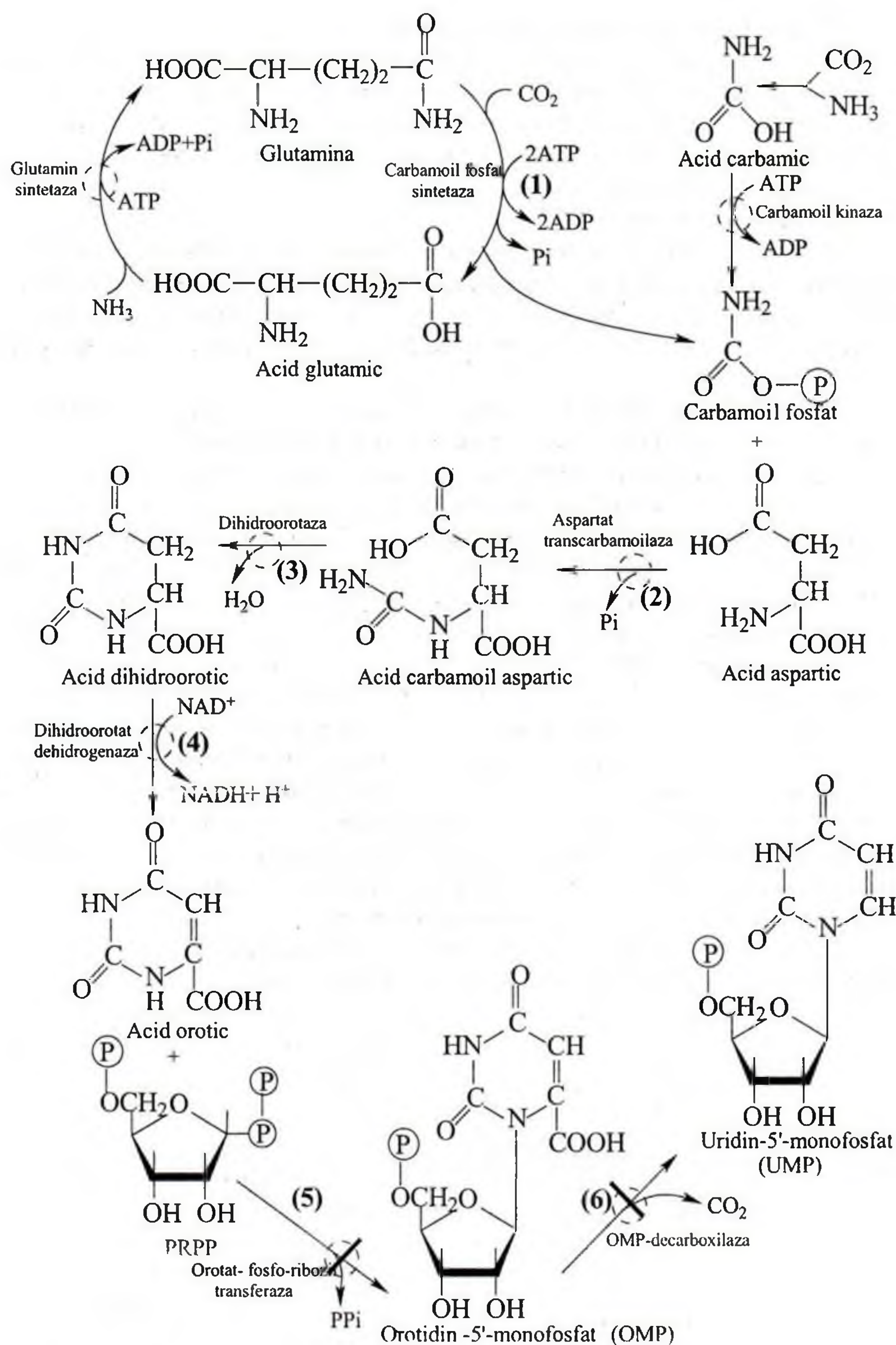


Figura 6.36. Sinteza pirimidinelor şi unele defecte metabolice

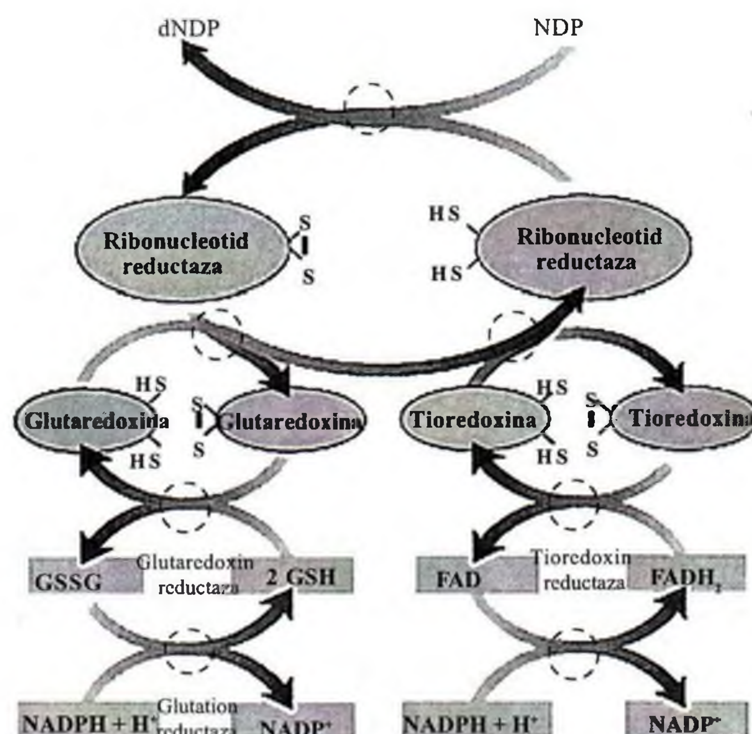


Figura 6.39. ***Reducerea ribonucleotidelor în dezoxiribonucleotide***

Ea constă din două subunități R_1 și R_2: R_1 are locusuri de fixare a substraturilor ribonucleice, efectorilor alosterici, conține grupe SH, donatori de electroni la reducerea restului ribozil; R_2 e o proteină ce conține Fe și S, participînd la formarea unui radical liber al restului de tirozină, funcționează în ansamblu. Reglarea enzimei e redată în fig. 6.40.

In structura DNA e prezentă și timina, analog metilat al uracilului. Cum se sintetizează acest dezoxiribonucleotid?

Se metilează dezoxiribonucleozid monofosfatul (dUMP). Enzima e timidilat sintază. Donator de CH_3 servește tetrahidrofolatul și nu S-adenozil metionina. -N^5, N^{10}- metilen-FH_4, cedînd grupa CH_3, se oxidează la dihidrofolat - FH_2, pierzînd H_2 necesari pentru formarea grupei CH_3.

Regenerarea FH_2 are loc sub acțiunea enzimei *dihidrofolat reductazei,* utilizînd NADPH (fig. 6.41).

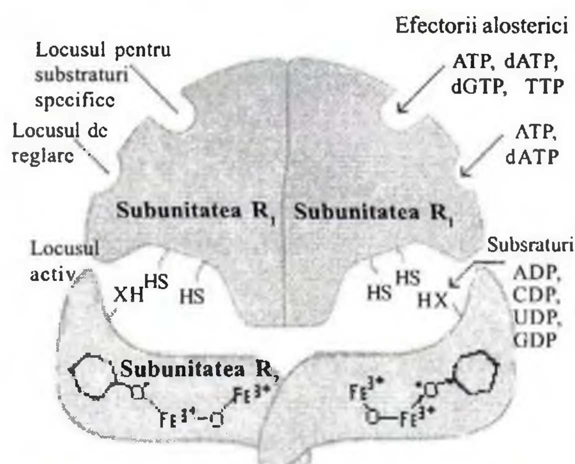


Figura 6.40. ***Structura și reglarea ribonucleotid reductazei***

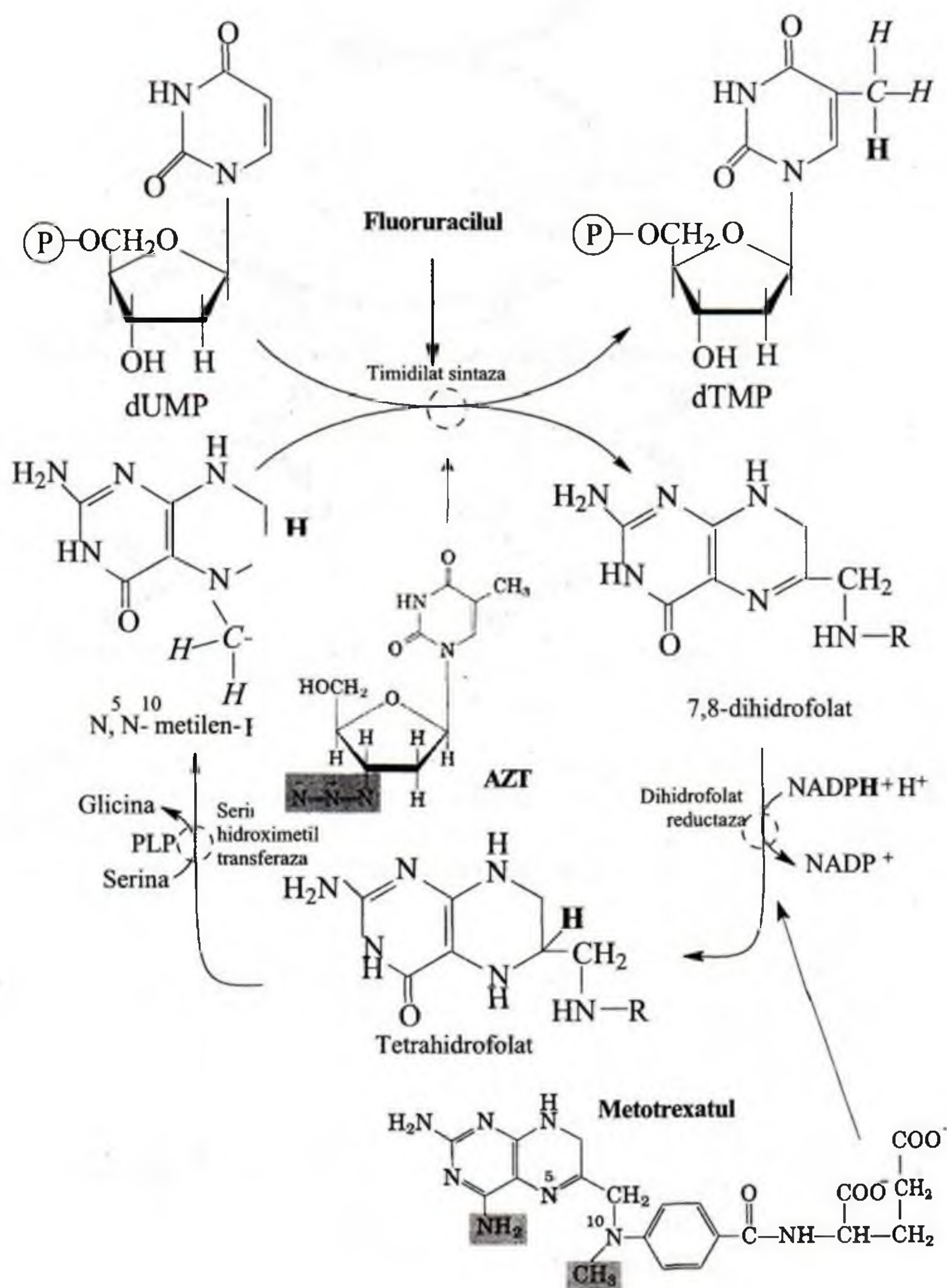


Figura 6.41. *Sinteza TMP*

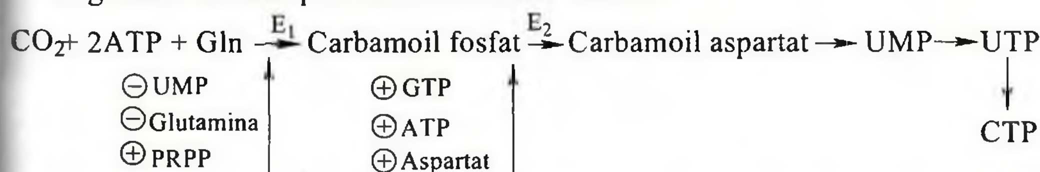
Țesuturile în diviziune, unde are loc o sinteză rapidă de TMP, sunt foarte sensibile la inhibiția *dihidrofolat reductazei*. De aceea, în chimioterapia cancerului ca factor de inhibiție poate fi folosită și timidilat sintaza. *Fluoruracilul* (analog al uracilului) ireversibil inhibă timidilat sintaza, formînd legături covalente între componenții reactivi și enzimă.

Aminopterina, ametopterina (metotrexatul) sunt analogi ai acidului folic, inhibitori competitivi ai dihidrofolat reductazei. Împiedică diviziunea celulară și *6-mercaptopurina, 6-tioguanina*. Un analog structural al nucleotidelor pirimidice este *azidotimidina (AZT)*, utilizată în tratamentul infecțiilor cu virusul imunodeficienței umane.

Reglarea metabolismului pirimidinic

Reglarea este fină, alosterică. dATP inhibă reducerea sa și stimulează reducerea pirimidinelor — dUDP, dCDP. TTP frînează reducerea pirimidinelor și stimulează reducerea purinelor.

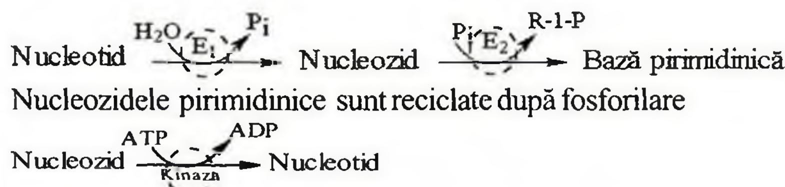
Reglarea biosintezei poate fi redată în felul următor:



Aspartat transcarbamoilaza (ATS-E₂) reprezintă o enzimă compusă din două subunități — catalitică și reglatoare. Activarea ATS de către ATP are în consecință: 1) echilibrarea vitezei de sinteză a nucleotidelor purinice și pirimidinice; 2) semnalează prezența ATP-lui în concentrații suficiente ca substrat pentru sinteza pirimidin nucleotidelor (UMP și carbamoil fosfatului). Sistemul de reglare e destul de complicat, dar asigură sinteza unor cantități echilibrate ale tuturor celor 4 dezoxiribonucleotide. Evident că ribonucleotid reductaza posedă stări conformaționale cu diferite proprietăți catalitice.

Reutilizarea și catabolismul nucleotidelor pirimidinice

Fondul metabolic al acestor compuși include compuși sintetizați de novo și cei eliberați din acizii nucleici celulari. Ca și în cazul purinelor, acizii nucleici exogeni nu contribuie la formarea acestui fond. În metabolismul pirimidinelor au loc reacții similare cu cele descrise la purine.



O kinază acceptă ca substrat uridina și citidina, iar alta — timidina. La purine această cale metabolică este de mică importanță, însăși adenozina fiind fosforilată în ATP. Bazele pirimidinice nu sunt reutilizate, ci degradate în compuși cu moleculă mică (fig 6.42). *β-alanina* și acidul *β-amino-izobutiric* sunt excretați sau catabolizați în căile respective.

Timina (Uracil)

Dihidrouracil dehidrogenaza: $NADPH + H^+$ → $NADP^+$

Dihidrotimina (Dihidrouracil)

Dihidropirimidinaza: H_2O

$H_2N-C(=O)-NH-CH_2-CH(CH_3\ (-H))-COO^-$

β-ureid-izobutirat (β-ureid-propionat)

β-ureidpropionaza: H_2O → $NH_4^+ + HCO_3^-$

$H_3\overset{+}{N}-CH_2-CH(CH_3\ (-H))-COO^-$

β-amino-izobutirat(β-alanina)

Aminotransferaza: α-cetoglutarat → Glutamat

$O=C(H)-CH(CH_3)-COO^-$

Metilmalonil semialdehidă

Figura 6.42. ***Catabolismul pirimidinelor***

Metabolismul cromoproteidelor

Structura hemoglobinei. Reprezintă proteine complexe, avînd ca constituenţi o proteină simplă şi un component neproteic — ionii metalici ai unor heterocicluri diverse, dintre care cei mai importanţi sunt hemul — hemoproteidele cu derivaţii săi: *hemoglobina (Hb), mioglobina, sistemul citocromic, catalaza, peroxidaza* şi *eritrocruorinele* — proteine situate în sîngele şi ţesuturile unor nevertebrate. O proteină fieroporfirinică este şi *triptofan pirolaza.*

O etapă semnificativă a evoluţiei a fost trecerea de la existenţa anaerobă la cea aerobă, cu surse bogate de energie. În prezenţa O_2, la scindarea glucozei, se formează de 18 ori mai multă energie decît în lipsa acesteia. Evolutiv, s-au format două mecanisme ce asigură aprovizionarea permanentă a celulelor cu cantităţi suficiente de O_2. Un mecanism primordial care asigură celulele cu O_2, este circulaţia sanguină. Dacă n-ar exista acest sistem, organismele aerobe n-ar depăşi 1 mm, fiindcă difuzia O_2 la distanţe mari s-ar produce foarte încet şi n-ar satisface cerinţele celulelor. Un alt mecanism adaptiv este apariţia, în timpul evoluţiei, a unor molecule transmiţătoare de oxigen, care permit ocolirea limitei cauzate de solubilitatea mică a O_2 în apă. Drept transportator serveşte hemo- şi mioglobina. Datorită Hb, creşte capacitatea sîngelui de a transporta O_2 de la 5 mL la 250 mL O_2 la un litru de sînge.

Hemoglobina participă la transportul CO_2 şi a H^+, totodată menţinînd echilibrul acido-bazic. Mioglobina muşchilor are funcţie de depozitare a O_2 şi facilitează transportul lui în acest ţesut. Capacitatea dată este determinată de prezenţa unei grupe prostetice numită **hem,** care explică culoarea roşie a acestor proteine. Hemul e compus dintr-o parte organică şi atomul de fier. Complexul organic conţine protoporfina formată din *patru grupe pirol* legate prin punţi metinice (−CH=), formînd un inel tetrapirolic. Acest inel ataşează patru grupe CH_3, două grupe vinil ($-CH=CH_2$) şi două catene propionice ($-CH_2-CH_2-COOH$). Eventual, sunt posibile 15 variante de aranjare în spaţiu a acestor substituenţi. Sistemele biologice conţin numai un izomer — *protoporfirina IX* (fig. 6.43). În centrul acestui inel atomul de Fe e ataşat cu patru atomi de azot. Fierul formează încă două legături coordonatoare (V şi VI) cu azotul din histidina V (directă), cu un rest de histidină proximală şi VI (indirectă) — histidină distală. Atomul de Fe în hem poate exista în fieroformă (F^{2+}) şi fieriformă (F^{3+}) sau *methemoglobină.* De menţionat că numai fieroforma poate adiţiona O_2.

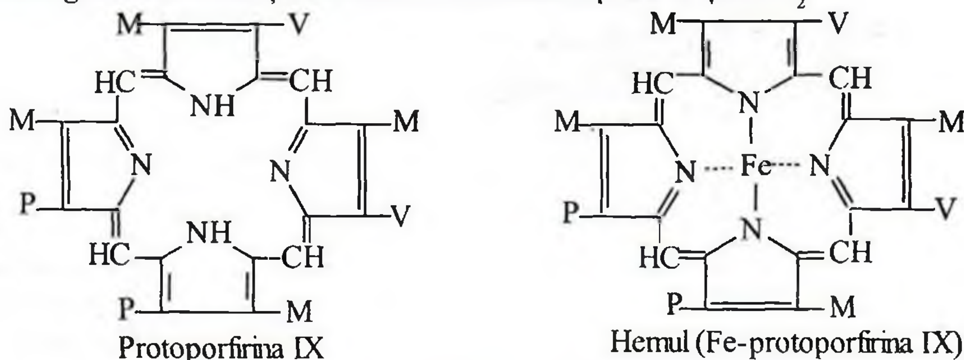


Figura 6.43. ***Structura protoporfirinei şi a hemului (M-metil, P-propionil, V-vinil)***

E stabilită structura tridimensională a mioglobinei (J.Kendrew), precum şi a hemoglobinei (M.Perutz). Molecula mioglobinei are o structură foarte compactă. În interiorul ei de fapt nu există cavităţi, în schimb conţine un singur lanţ polipeptidic, 75% al căruia include α-spirala cu 8 segmente de bază răsucite spre dreapta.

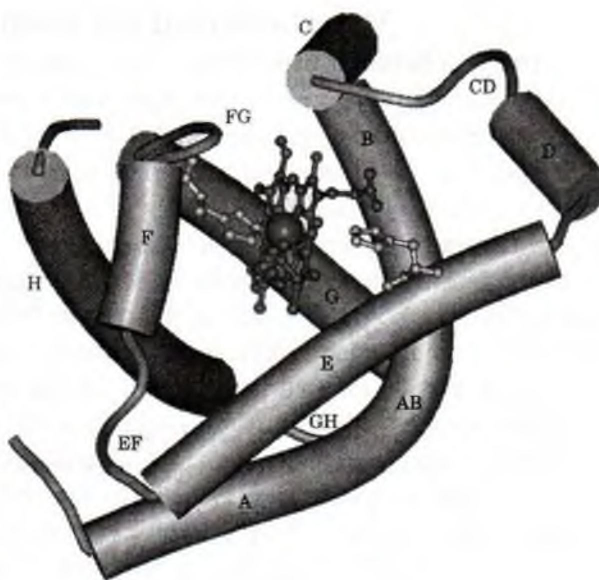


Figura 6.44. *Structura mioglobinei*

Între segmentele spiralate se intercalează 5 segmente nespiralate şi cîte unul se postează la capetele terminale. Se observă foarte bine partea exterioară şi cea interioară a moleculei. Ultima e formată aproape complet din resturi de aminoacizi nepolari; există numai 2 resturi de aminoacizi polari — 2 histidinc, ce se localizează în centrul activ şi îndeplinesc un rol primordial în activitatea funcţională. Grupa hemului e localizată în adîncitura moleculei de mioglobină. Locusul de fixare a oxigenului în mioglobină e indicat în fig. 6.44.

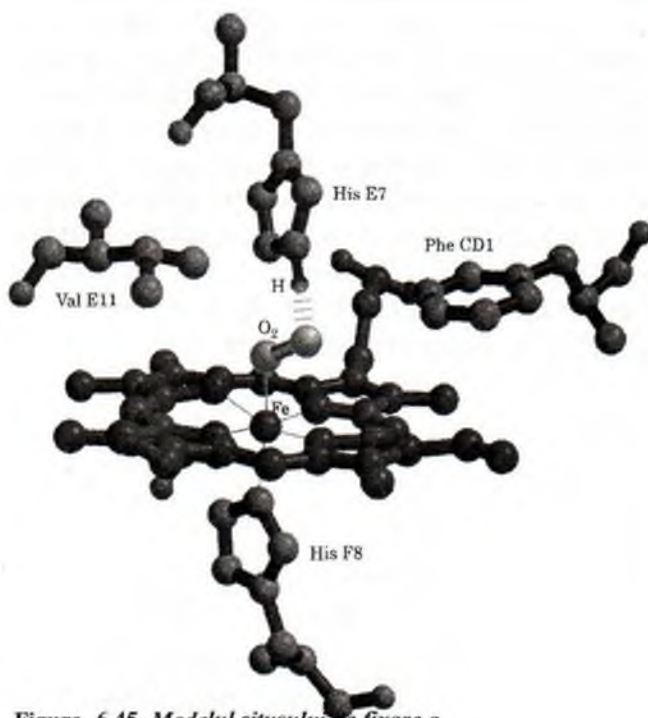


Figura 6.45. *Modelul situsului de fixare a oxigenului în hemul mioglobinei*

În legătura şase coordonatoare din fierihemoglobină se află apa, în dezoxihemoglobină — e liberă, în oxihemoglobină e ocupată de oxigen. În procesul oxigenării atomul de fier se apropie de planul hemului la 0,2Å. Hemul nu e o structură rigidă. Această deplasare joacă rolul-cheie în activitatea hemoglobinei. Locusul de fixare a hemului are o structură tridimensională (fig. 6.45).

Dacă oxigenul se leagă de hem, atunci care-i rolul componentei proteice în fixarea şi transportul oxigenului? Experienţele au demonstrat că în mioglobină se creează un microspaţiu al

grupei prostetice, datorită căreia hemul capătă proprietăţi deosebite. E o legitate generală ca funcţia grupei prostetice să fie dependentă de anturajul peptidic. Acelaşi hem e caracteristic şi citocromului C, dar el îndeplineşte altă funcţie — cea a transferului de electroni, pe cînd în enzima — catalaza, îi revine o altă funcţie.

Care este rolul acestei histidine distale?

Hemul are o afinitate mare la oxidul de carbon, fixarea lui e de 25000 ori mai mare decît a oxigenului, pe cînd în molecula hemoglobinei afinitatea e numai de 200 ori. Proteinele inhibă acest proces. Cum anume? (fig 6.46).

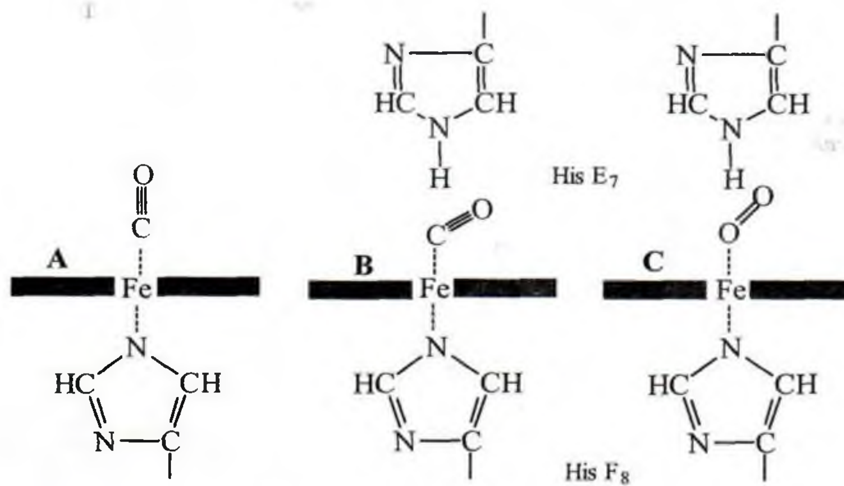


Figura 6.46. ***Baza structurală a afinităţii Hb şi Mb la CO***

Analiza RS şi spectroscopia infraroşie a complexului CO şi O_2 au confirmat că fieroporfirinele au o afinitate mare la CO. În acest complex atomii de Fe-C sunt situaţi pe un plan drept (A). În complex cu mioglobina osia CO se găseşte sub un unghi către legătura Fe-C, cauzată de prezenţa histidinei distale (B). Osia O_2 se plasează sub unghi către Fe-O şi în oxiHb (C). De aceea, sub influenţa proteinei, CO se şi situează sub un unghi, dar nu pe plan drept. O astfel de geometrie, determinată de globină, slăbeşte interacţiunea hemului cu CO şi, simultan, creează condiţii optime pentru fixarea O_2.

Micşorarea afinităţii la CO are o însemnătate primordială pentru decurgerea diverselor procese biologice, deoarece CO e o primejdie potenţială. CO, la scindarea hemului, formează o cantitate ce blochează aproximativ 1% de locusuri de fixare a O_2 în mio- şi hemoglobină. E un nivel neînsemnat, dar dacă afinitatea va fi atît de mare la fel ca în fieroporfirinele libere, CO format endogen ar provoca o intoxicaţie serioasă. Natura a soluţionat problema în aşa mod, încît în procesul evoluţiei au apărut proteinele hemocomponente, care, datorită unor factori sterici, slăbesc fixarea CO, nu şi a O_2.

Însuşi hemul are un efect decisiv asupra structurii mioglobinei, mioglobina fiind mult mai compactă decît apomioglobina — proteină fară hem.

Hemoglobina e compusă din patru lanţuri polipeptidice unite într-o conformaţie prin legături necovalente, are patru locusuri de fixare a oxigenului (fig. 6.47).

Se disting mai multe tipuri de Hb:

Hb A — hemoglobina de bază a omului matur compusă din 2 lanțuri α si 2β - $\alpha_2\beta_2$.

Hb A_2 — aproximativ 2% (porțiunea minoră) cu subunitățile sale $\alpha_2 S_2$.

Hb P — participă la diferite etape ale dezvoltării embrionare — $\alpha_2\varepsilon_2$.

Hb F — $\alpha_2\gamma_2$ reprezintă hemoglobina fetală.

Prin urmare, pentru toate tipurile α catena e identică și conține 141 resturi de aminoacizi, pe cînd catenele β, S, γ, ε — 146, cu o secvență aproape similară.

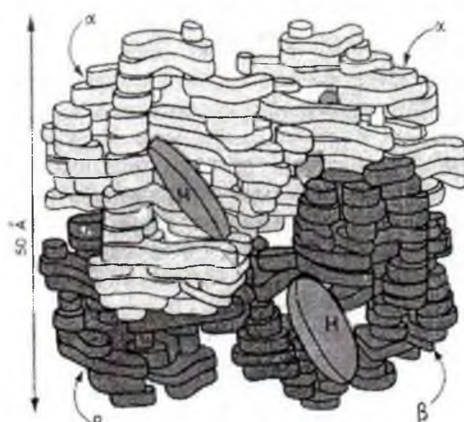


Figura 6.47. ***Modelul hemoglobinei: catene α și β, H - hemul***

Molecula hemoglobinei e aproape sferică, cu diametrul 55Å. Catenele formează un tetraedru, unde fiecare α contactează cu ambele β, pe cînd contactul dintre α sau β este relativ redus (fig. 6.48).

Structurile spațiale ale mioglobinei, ale α și β catene de hemoglobină au mari afinități, posedînd același rol biologic. Sensul configurației constă în crearea unui microspațiu în jurul hemului, care va determina reversibilitatea fixării oxigenului.

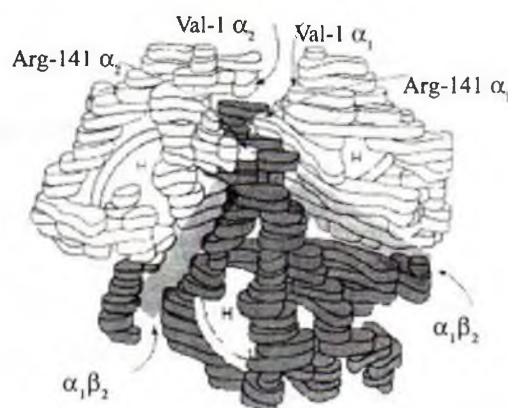


Figura 6.48. ***Contactele între catenele α și β în molecula hemoglobinei, H - hemul***

La descifrarea secvenței de aminoacizi, la mai mult de 20 de specii de animale s-au constatat deosebiri semnificative. În 9 poziții aceste secvențe conțin aceiași aminoacizi la toate speciile — *aminoacizi invarianți*-conservativi, care au o importanță majoră pentru funcționarea hemoglobinei — locusurile de fixare a O_2, stabilizarea moleculei etc.

E caracteristică și păstrarea intactă a caracterului nepolar al părții interioare a moleculei (cu modificări în aminoacizii nepolari). Această structură nepolară stabilizează structura spațială. Pe suprafața moleculei aminoacizii sunt extrem de variați.

Hemoglobina. Funcțiile.

1. E o proteină alosterică, pe care oxigenul se fixează cooperativ, adică adiționarea oxigenului la hemoglobină mărește gradul de fixare a celorlalte molecule de oxigen.

2. Afinitatea hemoglobinei la oxigen e dependentă de valorile pH și CO_2.

3. Afinitatea la oxigen este reglată de compuși fosfați organici — 2,3-difosfoglicerat.

Saturația hemoglobinei cu oxigen e dependentă de presiunea parțială a oxigenului și se exprimă prin curba disociației oxigenului. Curbele pentru mioglobină și hemoglobină sunt prezentate în figura 6.49.

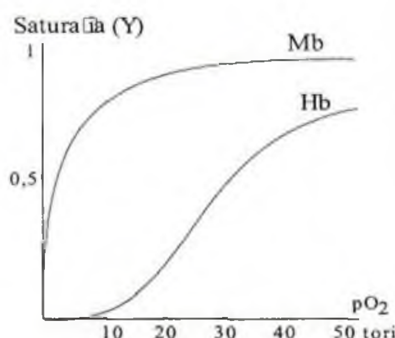


Figura 6.49. ***Curbele de disociație a oxigenului în hemoglobină și mioglobină***

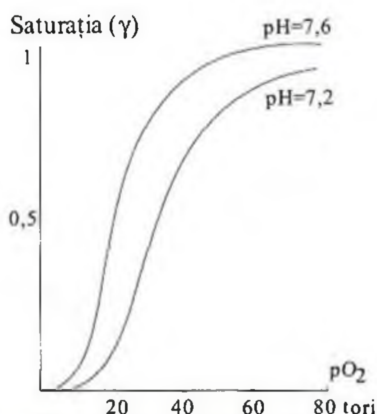


Figura 6.50. ***Influența pH asupra afinității hemoglobinei la oxigen***

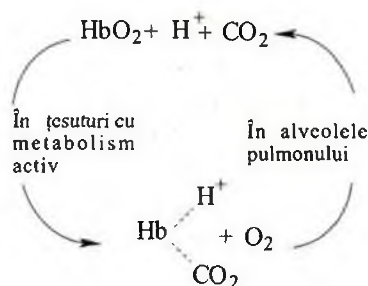


Figura 6.51. ***Efectul Haldane John***

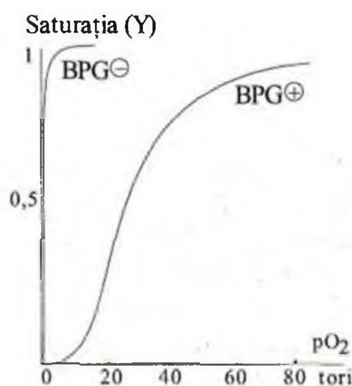


Figura 6.52. ***Influența BPG asupra afinității Hb la oxigen***

Mioglobina are o afinitate mai mare. Afinitatea se caracterizează prin mărimea P_{50} - egală cu presiunea parțială a O_2 la saturarea a 50% din locusurile de fixare (Y = 0,5). Pentru Mb P_{50}= 1tor, pentru Hb = 26tori (1tor = 1mmHg).

Curba disociației are pentru Mb formă hiperbolică, pentru Hb — sigmoidală și corespunde rolului fiziologic al celor două globine. La nivel molecular forma sigmoidală demonstrează că fixarea O_2 de Hb este cooperativă. Acest efect de fixare permite accelerarea eliberării O_2 în țesut.

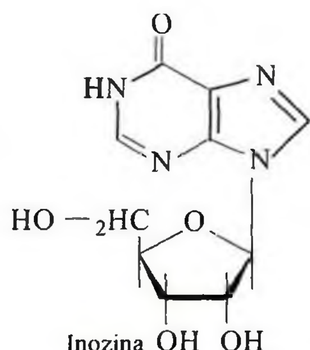
Deplasarea mediului interior spre acid deplasează, la rîndul ei, curba disociației spre dreapta, adică afinitatea la O_2 scade, eliberîndu-se mai ușor O_2. Sporirea concentrației de CO_2 are același efect, adică majorarea CO_2 și a H^+ în capilarele țesuturilor cu un nivel metabolic activ favorizează eliminarea O_2 din oxihemoglobină (efectul lui Bohr) (fig. 6.50).

În capilarele pulmonare, însă, concentrația majoră a O_2 favorizează eliberarea CO_2 și H^+ din hemoglobină (efectul Haldane John) (fig.6.51).

Afinitatea O_2 la hemoglobina din eritrocite e mult mai mică decît la hemoglobina din soluție. In 1967 s-a stabilit influența asupra afinității O_2 la Hb a 2,3-difosfo-gliceratului (BPG). În eritrocite se află în aceeași concentrație molară ca și în hemoglobină. În lipsa BPG P_{50} pentru Hb e de 1 tor, ca și la mioglobină, în prezența BPG P_{50} = 26 tori. BPG reduce afinitatea la O_2 de 26 ori (fig. 6.52).

Care-i mecanismul?

Adiționează la dezoxihemoglobină, dar nu la oxihemoglobină, fiindcă fixarea O_2 și a BPG simultană, sunt procese contrare. Care-i rolul BPG?



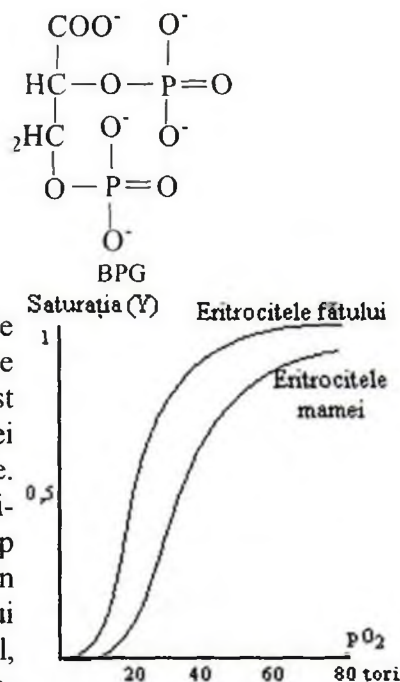


Figura 6.53. *Curbele afinității eritrocitelor mamei și fătului la O_2*

Acum cîțiva ani, nu era clar din ce cauză în sîngele conservat în mediu citrat-dextroză afinitatea la O_2 crește și P_{50} devine 16 (în loc de 26). S-a stabilit că acest fenomen e indispensabil de micșorarea concentrației de BPG de la 4,4 la 0,5 mmol - timp de 10 zile. Fenomenul are un rol decisiv: în patul sanguin eritrocitele fără BPG își restabilesc pe jumătate conținutul timp de 24 ore — termen defavorabil pentru bolnavii aflați în stare gravă. Adaosul BPG nu mărește concentrația lui în eritrocite, cauza fiind sarcina electrică mare. Astfel, compusul nu penetrează membrana celulară. În asemenea cazuri se poate evita scăderea BPG, adăugînd *inozină*. Moleculele ei, fără sarcină, pătrund în eritrocite și, printr-o serie de reacții, se transformă în BPG. În hipoxii (emfizem sau adaptare la înălțimi mari) crește mult nivelul BPG, care constituie un mecanism de adaptare.

Hemoglobina F are o afinitate mare la O_2, ceea ce creează condiții optime pentru transportul O_2 din sîngele mamei în sîngele fătului (fig. 6.53). Această Hb fixează slab BPG. Analiza RS a oxi- și dezoxiHb a demonstrat diferențierea semnificativă după structura lor cuaternară. Ca rezultat atașării O_2, perechea de subunități α-β își schimbă poziția față de altă pereche cu 15°. Există două tipuri de contacte — α_1-β_1 și α_1-β_2. Modificări structurale serioase sunt proprii celui de-al doilea tip, care se găsește în genele înrudite și e constituit din aminoacizi similari la toate vertebratele. Interacțiunea hem-hem e scăzută la mutațiile ce intră în acest contact.

În dezoxihemoglobină atomul de Fe iese din planul hemului cu 0,6Å ca rezultat al respingerii sterice ce apare între histidina proximală și atomii de N ai inelului porfirinic (fig. 6.54).

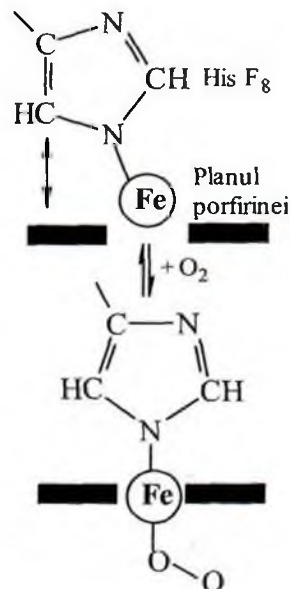


Figura 6.54. *Modificările poziției Fe în dezoxihemoglobină*

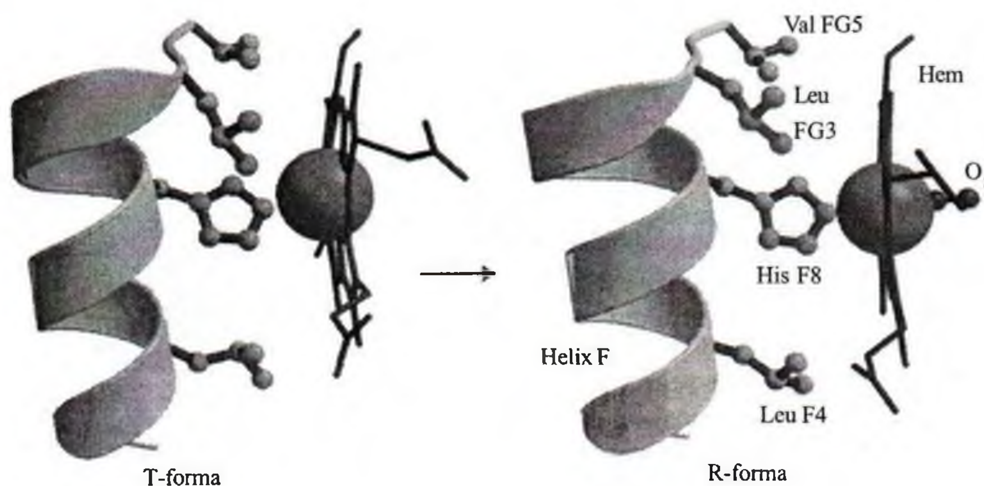


Figura 6.55. ***Transformările conformaționale ale hemului la oxigenare***

La oxigenare, Fe se deplasează în planul porfirinei, formînd legături cu O_2, şi are loc transformarea structurii cuaternare din forma T în R (fig. 6.55). Rolul primordial îl joacă catena laterală a histidinei proximale, pe care o atrage după ea deplasarea atomului de Fe (fig. 1.12). Hemul şi histidina proximală contactează cu catenele laterale ale 15 aminoacizi şi de aceea la oxigenare structura se modifică spre forma R. Modificările structurale din interiorul unei subunități conduce, însă, la schimbări structurale în regiunea contactelor celorlalte subunități şi ale întregii molecule (fig 6.56).

Dezoxihemoglobina are o structură rigidă amplificată de 8 legături saline între cele 4 subunități (fig. 6.57). Fixarea O_2 poate avea loc numai atunci cînd ruperea unor legături va permite atomului de Fe să se deplaseze în planul hemului. Cîte legături trebuie să se rupă pentru a adiționa o moleculă de O_2? Depinde de clasare — 1-4. Pentru fixarea primei molecule de O_2 e necesară desfacerea mai multor legături, comparativ cu fixarea celorlalte. Adiționarea a două - trei molecule ocupă o poziție intermediară între 1 şi 4.

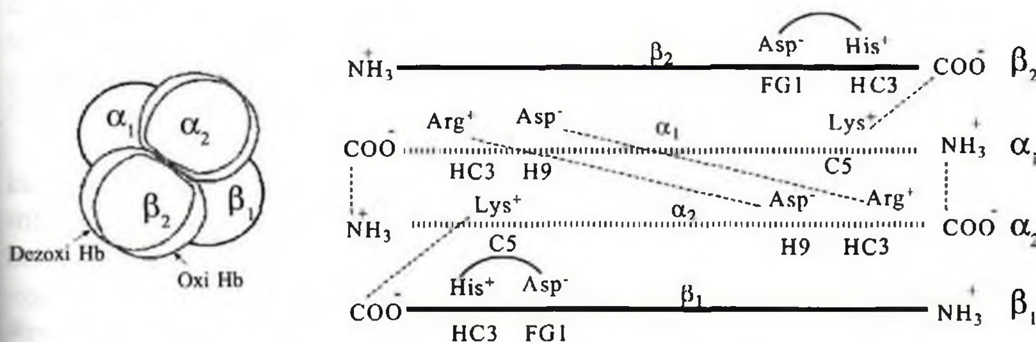


Figura 6.56. ***Schematic sunt redate modificările în structura cuaternară a Hb la oxigenare***

Figura 6.57. ***Legăturile transversale între subunități în dezoxihemoglobină***

O moleculă de BPG se fixează cu un tetramer de globulină. Locusul de fixare e format din resturile cu sarcină pozitivă ale catenelor β (lizină, histidină) (fig.6.58, fig. 6.59). El e conglomeratul alcătuit din 6 grupe cu sarcina (+) ale β catenei. O fixare mai slabă a BPG cu hemoglobina fătului se datorează prezenței serinei în loc de histidină.

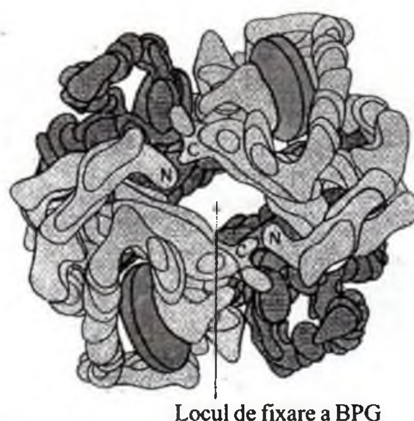


Figura 6.58. ***Fixarea BPG în molecula dezoxiHb***

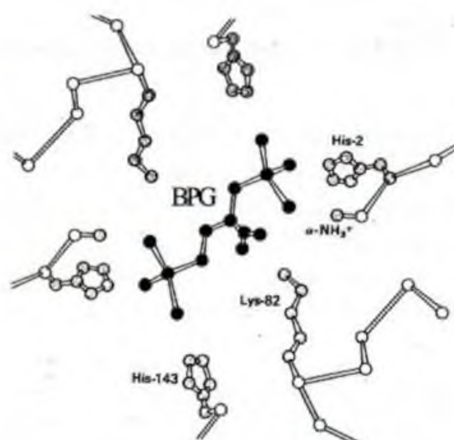


Figura 6.59. ***Interacțiunea BPG cu trei grupe încărcate pozitiv în β catene***

La oxigenare, BPG se detașează din cauza cavității centrale prea mici pentru el. BPG micșorează afinitatea la O_2, formînd legături încrucișate cu β–catenă, astfel stabilizînd structura cuaternară a Hb (T). Cu alte cuvinte, se creează legături auxiliare saline ce trebuie rupte și, în final, afinitatea Hb la O_2, în procesul adiției BPG, se reduce.

La organismele aerobe, la o moleculă de O_2 utilizată se formează 0,8 mol CO_2. Majoritatea lui este transportată prin sînge sub formă de bicarbonați, ce se formează în eritrocite sub acțiunea carbanhidrazei.



$$CO_2 + H_2O \longrightarrow HCO_3^- + H^+$$

O parte din CO_2 este transportată de hemoglobină în formă de carbonat, adiționîndu-se la grupa NH_2 ale celor patru catene.



$$R-NH_2 + CO_2 \longrightarrow R-NHCOO^- + H^+$$

Aceste legături saline stabilizează forma T, de aceea adiția CO_2 micșorează afinitatea hemoglobinei la oxigen.

Hemoglobina fixează la o moleculă eliberată de CO_2 aproximativ 0,5 molecule de H^+. Unde anume se fixează H^+? La moleculele de histidină care au o afinitate mare la H^+ în ambele β catene. Hidrogenul, la fel ca BPG, micșorează afinitatea la O_2, stabilizînd T forma de hemoglobină.

Patologia moleculară a hemoglobinei

Spre deosebire de Hb-A (Hb omului adult), există și Hb patologice. La anemia falciformă se înregistrează Hb-S — primul exemplu de boală moleculară descris. Hb-S se caracterizează prin prezența în β catenă (în poziția 6, la capătul N terminal), în locul acidului glutamic, a valinei, la care se diminuează solubilitatea hemoglobinei dezoxigenate. Solubilitatea Hb S oxigenate nu se modifică. Această schimbare conduce la apariția unui fragment capabil de agregare. După eliberarea O_2, are loc o transformare conformațională, cu apariția la suprafață a acestor zone ce conduc la agregarea mole-

culelor de Hb, la care se formează agregate mari, lungi, simultan deformînd eritrocitul, care capătă o formă drepanocitară. Cinetica formării fibrelor de dezoxihemoglobină are o importanță primordiala, căci de ea depinde configurația adevărată a eritrocitului care trece prin capilare (timp de 1 secundă). Procesul depinde de concentrația Hb-S. Scăderea concentrației de 2 ori (la heterozigote) micşorează viteza dc formare a fibrelor de 1000 ori. Organismele hetero- sunt rezistente la malarie, nu atestă anemie drepanocitară — caz tipic de polimorfism balansat adaptabil.

Sunt remarcate mai mult de 100 de Hb defectate, fără influență sau cu efect nociv.

Se diferențiază cîteva tipuri de anomalii ale Hb:

a) substituirile în partea exterioară a moleculei de Hb, practic, sunt benigne, cu excepția Hb S;

b) se modifică centrul activ. În Hb M histidina proximală sau distală e substituită cu tirozina ce conduce la stabilizarea formei oxidate (fieri) — complex al tirozinei cu Fe. Substituirea se poate produce în α şi β catene. Au fost depistate toate cele 4 variante mutante. Hb cu 2 hemuri în fieriformă — Hb M (methemoglobină) —se atestă la heterozigote; la homozigote conduce la un sfîrşit letal;

c) modificări în structura terțiară. În cazul dat formarea conformației normale a moleculelor nu are loc şi astfel de tipuri de hemoglobină nu sunt stabile (glicina e substituită cu arginina). Sunt înregistrate Hb incapabile să rețină hemul datorită modificărilor conformaționale;

d) modificări în structura cuaternară. Aceste mutații ating regiunea contactelor, ceea ce cauzează pierderea proprietăților alosterice însoțită de tulburări ale afinității față de O_2.

Modificările în regiunea contactului α_1, β_2 conduc la cooperativitate joasă, concomitent sporind afinitatea la O_2. Contactele între subunitățile de acelaşi tip sunt polare, iar între subunitățile de tip diferit — mai intense şi nepolare. Se atestă cîteva cazuri:

1) substituirea aspartatului în β catenă cu asparagina micşorează P_{50} de la 26 la 15 tori (*Hb-Kempsey*);

2) substituirea în α catenă a aspartatului cu treonină măreşte afinitatea la P_{50} egală cu 70 tori (*Hb-Kansas*).

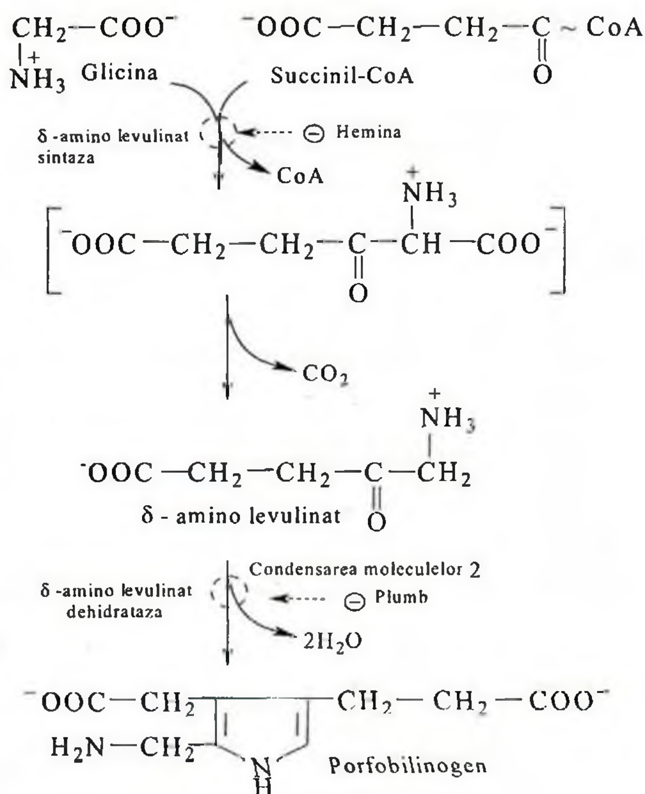


Figura 6.60. ***Sinteza porfobilinogenului***

Sinteza hemului

Experimentele cu administrarea atomilor marcați, efectuate de David Shemin cu colaboratorii, au demonstrat că precursorul hemului se formează prin condensarea glicinei cu succinatul activ la sinteza amino-levulinatului. Reacția este catalizată de δ – amino-levulinat sintază (E_1) dependentă de vit.B_6.

Amino levulinat sintaza este o enzimă mitocondrială reglatoare. Viteza de reacție crește în lipsa hemului. Apoi 2 molecule de δ-amino-levulinat se condensează, cu formarea porfobilinogenului. E o reacție catalizată de o dehidratază (E_2). Enzima este localizată în citozol, conține Zn și este inhibată de ionii de plumb.

În consecință, 4 molecule de porfobilinogen se condensează, formînd un tetrapirol, care, dezaminîndu-se, se ciclizează producînd *uroporfirinogenul*. Prin decarboxilare și oxidări succesive, se produce *protoporfirina IX*. O *hemosintetază*, enzimă mitocondrială, introduce fierul; enzima conține grupa SH. Pentru sinteza hemului sunt necesari și următorii compuși: acidul tetrahidrofolic, vit. B_{12}, Cu^{++} (fig. 6.60 și fig. 6.61).

Fierul este transferat de o *transferină* Fe^{3+}, ce reprezintă o proteină. O altă proteină îl depozitează în țesut sub formă de *feritină*. Cavitatea interioară

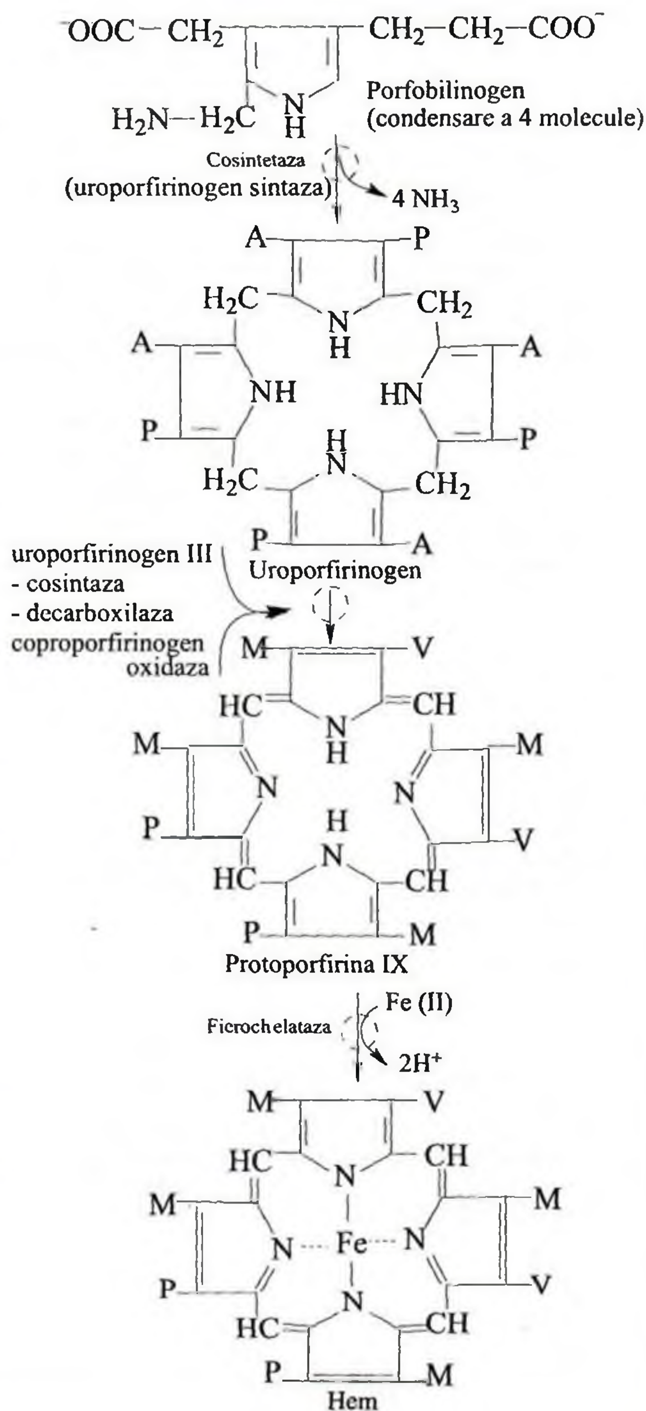


Figura 6.61. ***Formarea hemului. V - vinil, M - metil, P - propionil***

a acestei proteine poate fixa pînă la 4500 fierioni. În organism se conțin aproximativ 4,5-5,0 g de Fe; pe contul Hb = 60-70%; mioglobinei = 3,5-5,0%; feritinei = 20%; transferinei = 0,18%, fierului funcțional din țesuturi îi revine 5%.

Fireşte, fierul cromoproteidelor alimentare nu se utilizează pentru sinteza fieroproteidelor din organism, deoarece hemul se oxidează în *hematina* care nu se absoarbe în intestin. Acest pigment se elimină prin masele fecale.

Drept sursă de fier pentru scopuri sintetice servesc alimentele şi, de asemenea, fierul ce se eliberează la degradarea eritrocitelor. În procesul sintezei cele trei enzime enumerate se reglează prin retroinhibiție de hem.

Degradarea hemului

Eritrocitele viețuiesc aproape 120 de zile. Zilnic se degradează şi se sintetizează în organism 6-7 grame hemoglobină. Celulele vechi sunt eliminate din sistemul circulant şi scindate în splină de celulele sistemului macrofagal. La prima etapă hemoglobina eliberată prin liza hematiilor îmbatrînite formează cu haptoglobina un complex Hb- haptoglobină (ultima e o α_2-glicoproteină serică).

Complexul este supus oxidării enzimatice microzomale, cu formarea unor compuşi intermediari ca coleglobina, verdoglobina, care apoi pierd globina, transformîndu-se în hem. Globina se hidrolizează pînă la aminoacizi, iar fierul din hem este fixat de transferina plasmei, apoi poate fi depozitat în ficat sau reciclat.

Reacția de degradare a hemului constă în scindarea punții metenilice α, cu deschiderea ciclului tetrapirolic (fig.6.62). Reacția e catalizată de *hemooxigenaza* numită şi *α-metinil-oxigenaza,* care are două particularități:

a) se prezintă drept o monooxigenază solicitantă a O_2 şi NADPH;

b) carbonul punții metenilice se elimină sub formă de CO. Participă, în calitate de cofactori, vitamina C, Fe^{2+}. Asta e unica reacție în organism unde se eliberează CO.

Ulterior, puntea metenilică centrală în *biliverdină* se reduce sub acțiunea *biliverdin reductazei*, utilizînd NADPH, cu formarea *bilirubinei*. Biliverdin reductaza este prezentă în numeroase țesuturi, dar prioritar în ficat. În mod normal, bila conține numai urme de biliverdină, dar grație culorii sale intense, ea imprimă bilei o culoare verzuie. Bilirubina liberă în exces este un decuplant al fosforilării oxidative, ce duce la inhibarea sintezei de ATP.

Bilirubina, în complex cu albumina serică, e denumită *bilirubină liberă indirectă*, cu o cotă de 75% din toată cantitatea (2,5 - 12mg/L, 8,7-20,5 µm/mol), fiind transferată apoi în ficat. Bilirubina indirectă este toxică, nu trece prin filtrul renal şi nu se elimină prin bilă. Bilirubina liberă este solubilă în solvenți organici şi numai apoi dă reacție cu diazoreactivul (*reacție indirectă*). Aici, în ficat, se modifică în formă mai solubilă, conjugată cu acidul glucuronic, ce adiționează la catenele propionice. Sub formă de diglucuronid este excretată prin bilă — *bilirubina directă* (fig. 6.62).

Un rol important în procesul de eliminare a bilirubinei la nivelul celulei hepatice îi revine proteinei transportatoare — *ligandina* (masa moleculară aproximativ 44000 Da), ce reprezintă aproximativ 6% din totalul proteinelor hepatice.

În intestine, sub acțiunea enzimelor bacteriene, ce scindează acidul glucuronic, fiind redusă (bilirubina) prin mezobilirubin la mezobilirubinogen. Aproximativ 4 mg e cantita-

tea diurnă de urobilinogen şi aproximativ 300 mg e cea de stercobilinogen.

Bilirubina fiind redusă (2 vinil ⟶ 2 etil şi 2 metin ⟶ 2 metilen), va fi transformată în urobilinogen care, prin reducerea legăturilor duble din nucleele terminale, se va transforma în *stercobilinogen*. În continuare, dehidrogenarea acestor compuşi la nivelul punţii γ-metinice rezultă *urobilina* şi *stercobilina* — principalii pigmenţi ai materialelor fecale.

O mică parte din bilirubină, urobilinogen şi stercobilinogen se reabsoarbe din intestin în circulaţia portală, ajungînd la ficat, de unde sunt reexcretaţi prin bilă — *ciclul entero-hepatic al pigmenţilor biliari*. Cantitaţi mici se elimină prin urină, excreţia urinara a acestor compuşi — urobilinogen, stercobilinogen — creşte în insuficienţa hepatică.

Sunt atestate cîteva *tulburări genetice ale metabolismului porfirinelor*, ce se caracterizează prin excreţia crescută de porfirine şi precursori ai acestora.

1. *Porfiria intermitentă acută*. Sunt afectate celulele ficatului, reducîndu-se activitatea uroporfirinogen sintazei şi, compensator, amplificată de γ-amino levulinat sintaza, creşte concentraţia amino levulinatului şi a porfobilinogenului în ficat, eliminîndu-se prin urină, ceea ce cauzează dereglări neurologice, dereglări intermitente în abdomen.

2. *Porfiria eritropoetică congenitală*. E diminuată de activitatea enzimelor (*cosintază, izomerază*), provocînd acumularea uroporfirinei, coproporfirinci. Eritrocitele se distrug prematur. Urina e de culoare roşie, dinţii — roză, pielea — sensibilă la lumină.

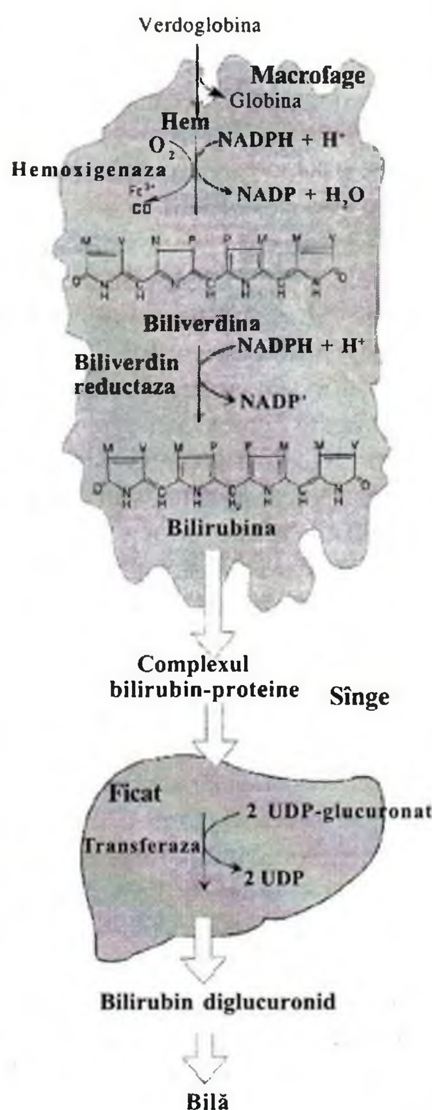


Figura 6.62. ***Formarea bilirubinei***

3. Sunt studiate şi *porfirinele hepatice primare* — "*porfiria cutanea tarda*" — ce se caracterizează prin hipersinteză şi eliminare urinară de uro- şi coproporfirina I. Pacienţii sunt fotosensibili — cauza e deficienţa de *uropofirinogen decarboxilaza*.

4. La deficienţa *coproporfirinogen oxidazei* (coproporfiria ereditară), se acumulează şi se elimină prin urină coproporfirinogen III şi alte intermediate — porfobilinogen, ac.δ-amino levulinic. Manifestările clinice sunt asemanătoare cu cele din porfiria acută intermitentă.

5. La insuficienţa *ALA — dehidratazei* şi a *fierochelatazei,* se acumulează în urină coproporfirina III şi acidul δ-amino levulinic. Deficitul fierochelatazei în ţesuturi duce la protoporfirie — eritrocitele, plasma, fecalele conţin cantităţii mari de protoporfirina IX. Bolnavii sunt fotosensibili, au ciroza şi urticărie prin expunere la soare.

Creşterea activităţii *amino levulinat sintazei* duce la *porfirie toxică* — prin urină se elimina ac. amino levulinic şi porfobilinogen, coproporfirina III. Organismul reacţionează vădit la droguri, înclusiv la alcool.

6. Hepatitele şi cirozele se caracterizează prin *coproporfirinii secundare* cu izomeri de tip I; intoxicaţiile alcoolice şi ciroza etilică — prin izomeri de tip III.

Rolul ficatului în metabolism

Ficatul are un rol metabolic multiplu. În condiții normale și în situații patologice, el constituie "laboratorul central al organismului". În ficat, spre deosebire de orice alt organ, interdependența metabolismelor hidraților de carbon, ale grăsimilor, proteinelor constituie o condiție indispensabilă a diversității sale funcționale. Fondul metabolic intracelular este extrem de larg implicat în activitatea specifică a celulei hepatice, care are o mare capacitate anabolică și o caracteristică energetică deosebită.

Hepatocitele sunt detaliat studiate datorită disponibilității lor mari (chiar și la om), precum și simplității de obținere a elementelor ultrastructurale (nuclee, mitocondrii etc.).

Prin cele 2 tipuri de celule parenchimatoase și ale sistemului reticulo-histocitar (macrofagal), ficatul exercită funcții complexe ce pot fi grupate în trei categorii mari: participarea la procesele metabolice, secreția bilei și dezintoxicarea.

Materia obținută prin vena portă, intrînd în contact cu celulele hepatice (în funcție de natura celulelor hepatice), este supusă unor prelucrări adecvate. Substanțele inerte și particulele cu dimensiuni mai mari se fixează în celulele Kupffer. Componentele chimice sunt metabolizate la nivelul celulelor parenchimatoase.

Metabolismul glucidic (fig.6.63).

Echilibrul dinamic la asigurarea glucozei sanguine e realizat atît prin depozitarea acesteia în formă de glicogen (fosforilare determinată de glucokinază, enzimă adaptivă), cît și de mobilizarea ei din aceste rezerve. Există glicogen liber ușor extractibil și desmoglicogen greu extractibil. Depunerea lui ca rezervă și depleţiunea rezervelor din ficat par a fi în raport cu creșterea sau micșorarea greutății moleculare a polizaharidului, decît cu modificările numărului de molecule. Moleculele de dimensiuni diferite ale glicogenului nu participă la metabolism în mod identic.

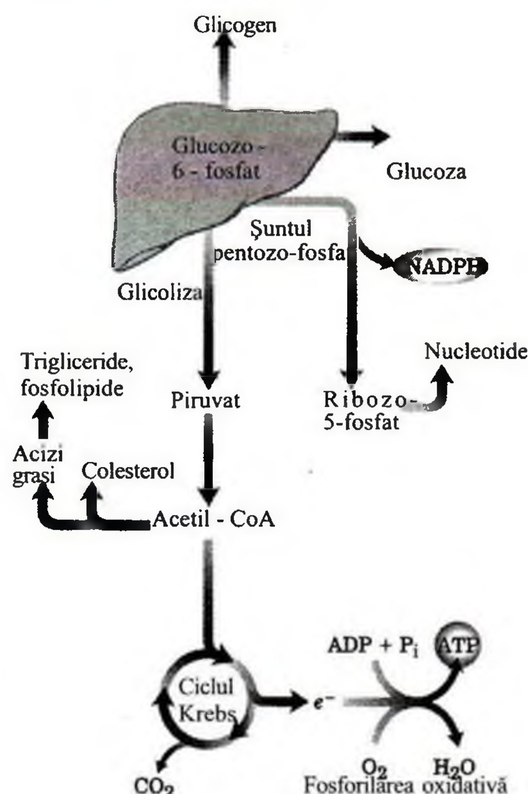


Figura 6.63. *Metabolizarea glucozo -6- fosfat în ficat*

S-a stabilit că încorporarea glucozei se realizează îndeosebi în moleculele de glicogen cu greutate moleculară mică. Ficatul este:

— singurul organ ce utilizează pentru sinteza glicogenului, în afară de glucoză, și alte hexoze, fructoza, manoza, galactoza;

— unicul organ ce asigură sinteza glicogenlui pornită de la acidul lactic, glicerol sau de la alți metaboliți intermediari proveniți din lipide sau proteine (gluconeogeneză);

— în el degradarea glucozei, preponderent de la 50% la 75%, are loc pe calea şuntării hexozo-monofosfaţilor, cu sinteza simultană a NADPH şi pentozelor;

— în ficat se sintetizează heparina. La metabolismul glicoproteinelor sunt implicate enzimele N-acetil-glucozoamin şi N-acetil-galactozoamin kinaza.

Metabolismul lipidic (fig.6.64)

Are loc realizarea următoarelor procese:

— preluarea lipidelor alimentare, în special a TAG (chilomicronii), a acizilor graşi, cu un număr mediu de atomi de carbon în catenă;

— captarea acizilor graşi proveniţi din lipidele ţesutului adipos şi transportaţi prin intermediul albuminei serice spre ficat;

— sinteza acizilor graşi, cu formarea de TAG, pe care hepatocitul îi încorporează în pre-β lipoproteine;

— remanierea metabolică a acizilor graşi, elongarea lanţului de carbon (C_{24}), desaturarea acidului linolenic în acid arahidonic; acidului oleic — în eicosatrienoic; peroxidarea acizilor polinesaturaţi formaţi;

— catabolismul acizilor graşi prin β-oxidare, proces ce solicită prezenţa carnitinei, a CoA sintetizat din acidul pantotenic şi aminoacizi cu sulf;

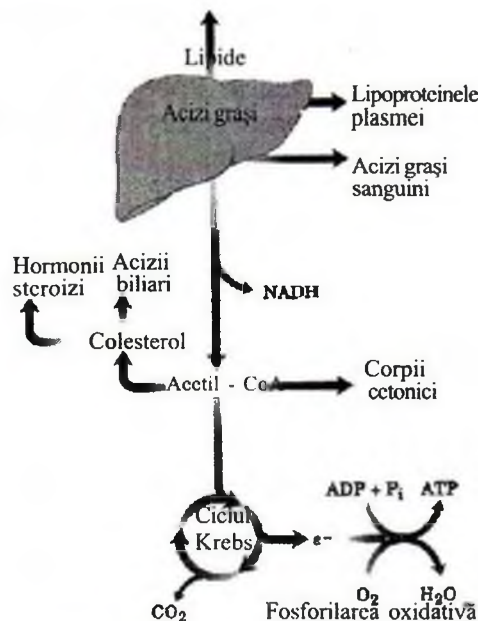


Figura 6.64. ***Metabolismul acizilor graşi în ficat***

— formarea corpilor cetonici la β–oxidare, reprezentînd substraturi cu valori energetice mari utilizaţi extrahepatic (rinichi, miocard);

— implicarea în ciclul glucozei a acizilor graşi; importanţa biologică constă în faptul că excesul de glucoză favorizează sinteza TAG şi inhibă eliberarea acizilor graşi, iar în lipsa glucozei fenomenul se declanşează invers;

— toate organele sunt apte de a sintetiza fosfatidele proprii, însă numai ficatul le poate remite plasmei. Aşadar, fosfatidele plasmatice sunt de origine hepatică. Biosinteza lor presupune etape anterioare la care se produc componentele structurale ale acestor molecule complexe, în final — cu participarea derivaţilor citidinfosfatului;

— la utilizarea metabolică a glicerolului rolul principal constă în posedarea unei glicerol kinaze active;

— în biosinteza, esterificarea şi transformarea colestrerolului în acizi biliari 2/3 din colesterol este de natură endogenă şi 1/3 e esterificată sub acţiunea lecitin-colesterol-acil transferazei.

Metabolismul proteic

Contribuţia ficatului la acest metabolism este de cea mai mare importanţă şi se exercită în două direcţii decisive pentru organism.

Metabolismul aminoacizilor (fig. 6.65).

Se produce degradarea acestora, concomitent cu reutilizarea şi integrarea amoniacului în uree şi glutamină (prin glutamin sintetază, care constituie şi mecanismul principal de neutralizare a NH_3 la nivelul creierului). Etapa hepatică specifică constă în transformarea ornitinei în citrulină, pe cînd modificarea în ornitină potenţial se realizează şi la nivelul rinichilor.

Unii aminoacizi au o utilizare metabolică specifică: încorporarea glicocolului, transmetilarea metioninei, desulfurarea cisteinei, transaminarea tirozinei, oxidarea acidului homogentizic, formarea acidului urocanic, degradarea kinureninei. Acidul cisteic este transformat în taurină (sub influenţa aminoacid decarboxilazei). Aminoacizii glucoformatori sunt utilizaţi, după dezaminare, în gluconeogeneză.

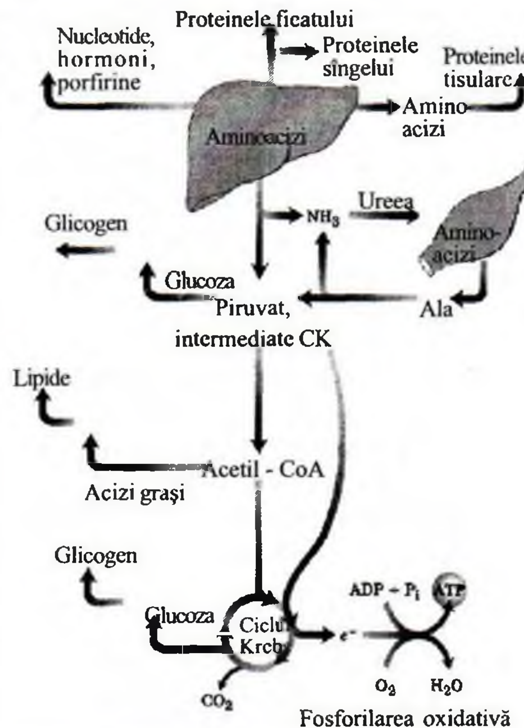


Figura 6.65. ***Metabolismul aminoacizilor în ficat***

Metabolismul proteinelor

Ficatul sintetizează, pe lîngă proteinele structurale proprii, o bună parte din proteinele plasmatice, o parte din factorii proteici ai coagulării, imunoglobulinele. Aici e şi sediul principal al catabolismului pirimidinelor, degradarea nucleoproteinelor pînă la acidul uric, sub acţiunea xantin oxidazei (de altfel, are loc şi metabolismul porfirinelor, cu sinteza şi degradarea lor pînă la producerea bilirubinei). Nivelul bilirubinei totale e de 17 µmol/L, 85% din care fiind de origine eritrocitară (hemoglobina).

Funcţia de dezintoxicare

Se exercită în două moduri ce se pot asocia şi completa reciproc: reducerea toxicităţii şi mărirea capacităţii de eliminare a produsului prin urină sau bilă. În esenţa sa, mecanismele măresc polaritatea substanţelor, transformîndu-le din compuşi liposolubili în componente cu un grad mai înalt de hidrosolubilitate. Aceste procese au cîteva proprietăţi: nu sunt selective sau dirijate de o finalitate prestabilită şi exclusivă (nu sunt în mod obligatoriu "detoxifiante"). O bună parte din enzimele implicate activ la neutralizarea substanţelor străine au o specificitate neînsemnată faţă de substrat (enzimele normale). Majoritatea medicamentelor şi substanţelor străine (xenobioticele), însă, sunt metabolizate de enzime microzomale, mai puţin numeroase şi nespecifice. Sistemul este unic şi universal, cu implicarea oxidazelor ce posedă funcţii mixte. Normal, ele sunt în stare inactivă şi pot fi induse sub acţiunea substanţelor străine. O substanţă devine inactivă prin implicarea mai multor mecanisme concurente, cu preponderenţa unuia sau altuia.

Dezintoxicarea se realizează prin 4 tipuri de reacţii chimice: oxidare, reducere, hidroliză, condensare (sinteză). Ele se desfăşoară în 2 faze:

I) faza proceselor de oxido-reducere şi hidroliză, finalizată prin hidroxilarea substratului;

II) faza de conjugare (sinteză).

Faza I. E determinată de activitatea sistemului monooxidazic microzomal. Enzimele la această fază utilizează lanţul de transport electronic microzomal, alcătuiesc un sistem monooxidazic cunoscut sub denumirea de oxigenaze cu funcţii mixte microzomale; se mai numesc şi hidroxilaze microzomale, datorită hidroxilării finale a substratului.

Sistemul are urmatoarele componente:

a) Citocromul P_{450} acţionează în formă oxidată şi se cuplează la substratul pe care îl va oxida, parcurgînd etape de evoluţii conformaţionale ale hemoproteinei oxidate;

— NADPH citocrom C reductaza, flavin-enzimă, participantă la oxidarea NADPH;

— NADPH citocrom P_{450} reductază, donator de electroni, care asigură reducerea citocromului P_{450} oxidat;

— citocromul B_5 şi NADH (donator al doilea de electroni).

b) Fosfatidil-cholina din componenţa membranei microzomale este esenţială pentru transferul de electroni de la NADPH citocrom C reductaza la citocromul P_{450} (necesară pentru fixarea substratului şi a inducţiei citocromului P_{450}), elementul principal constituindu-l citocromul P_{450}.

Ciclul de reacţii la care participă citocromul P_{450} este următorul (fig.6.66):

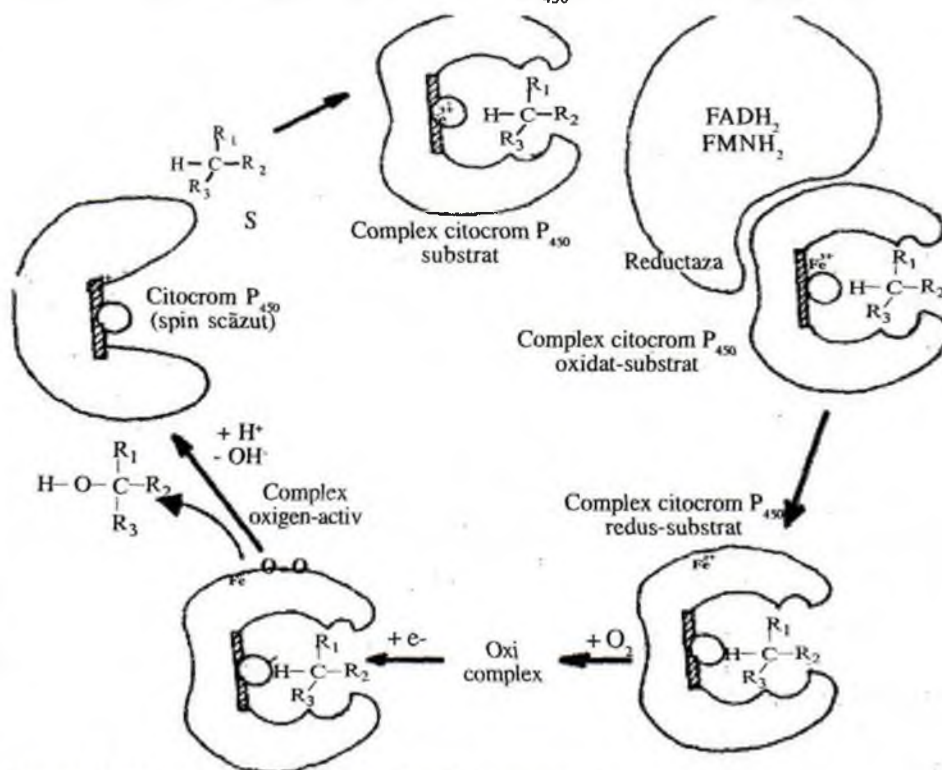


Figura 6.66. ***Ciclul reacţiilor în care activează citocromul P_{450}***

1) legarea substratului la citocromul P_{450}, cu substituirea conformației hemoproteinei și transformarea ei din starea de "spin" scăzut în cea de "spin" înalt;

2) reducerea Fe citocromic prin transferul de e^- de la NADPH- reductază;

3) activarea O_2, cu formarea unui complex oxigen activ pînă la anion superoxid;

4) transferul atomului de oxigen, cu hidroxilarea substratului și eliberarea citocromului P_{450} la "spin" scăzut.

Principalele reacții enzimatice ale fazei I sunt:

a) *oxidarea*: 1) hidroxilarea alifatică, aromatică, hidroxilarea mixtă; 2) O- și N-dezalchilarea; 3) N-oxidarea; 4) dezaminarea oxidativă; 5) alte forme de oxidare;

b) *reducerea*;

c) *hidroliza*.

Faza II. Mecanismul general al conjugării constă din reacții endergonice (cu utilizarea ATP drept sursă de energie). Spre deosebire de reacțiile fazei I legate de specie, cele din faza II sunt filogenetic diferite: la om are loc conjugarea cu acid glucuronic, glicocol, glutamină.

Ambele faze sunt proprii membranei microzomale, iar în partea interioară e localizată glucuronil transferaza.

1) *Calea principală e glucurono-conjugarea.* Sistemul care catalizează conjugarea implică formarea acidului uridindifosfoglucuronic. Enzima E_1 e UDPGA transferaza.

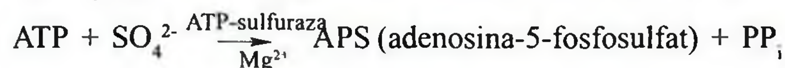

1. G-1-P + UTP → UDPG + PP_i

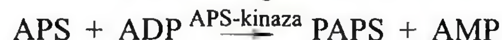

2. UDPG + 2NAD$^+$ → UDPGA + 2NADH + 2H$^+$


3. UDPGA + 3XH → X-GA + UDP

(X poate fi: O, CO, NH, S). În cursul acestor reacții se efectuează inversiunea legăturii glucuronozidice (tipul α trece în β) a conjugatului care este hidrolizabilă pentru β-glucuronidază. În ficat glucurono-conjugarea se diminuează prin efectul pirofosfatazei microzomale care hidrolizează UDPGA la ac. 1-P-glucuronic și prin β-glucuronidaza lizozomală care hidrolizează O-glucuronații.

2) *Conjugarea cu sulf* (3'-P-adenosina-5'-P-sulfat - PAPS):


ATP + SO_4^{2-} $\xrightarrow[Mg^{2+}]{\text{ATP-sulfuraza}}$ APS (adenosina-5-fosfosulfat) + PP_i


APS + ADP $\xrightarrow{\text{APS-kinaza}}$ PAPS + AMP


PAPS + Fenol $\xrightarrow{\text{Sulfokinaza}}$ Fenilsulfat + PAP (acid 3'-fosfoadenilic)

3) *Conjugarea cu aminoacizi:* glicină și glutamină

a) glicina e utilizată pentru acizii aromatici, heterociclici etc:


ATP + CoASH → AMP + CoA-S-pirofosfat


CoA-S-pirofosfat + Acid benzoic → Benzoil-S-CoA + PP_i


Benzoil-S-CoA + Glicocol → Acid hipuric + SH-CoA

(Glicocolul este de origine, preponderent, hepatică, iar reacția decurge în rinichi și parțial în ficat).

b) Grupa NH_2 a glutaminei formează o grupare amidică cu grupa COOH a drogului.

4) *Acilarea prin transacilare* normal se produce în ficat. În aşa mod se detoxifică sulfamidele.

Nivelul de metabolizare a medicamentelor poate fi scăzut sau inhibat. Activitatea poate fi şi prelungită. Foarte importantă este inducţia enzimatică microzomală. Cel mai profund este studiat fenobarbitalul, inductor al glucuronil transferazei, al nivelului citocromului P_{450} (enzime implicate în metabolizarea medicamentelor).

Patologia biochimică a ficatului poate fi congenitală şi dobîndită. Prima se exprimă prin variate deficienţe enzimatice, pe cînd a doua — prin sindromul icter, care apare la mărirea concentraţiei bilirubinei serice peste 1,2-2mg%, la care pigmentul pătrunde în ţesuturi. Icterul este expresia unui exces de substanţe ce depăşeşte capacitatea de excreţie sau a unei leziuni hepato-celulare, precum şi a unui obstacol în calea scurgerii bilei.

Colestaza reprezintă schimbări biochimice care se aseamănă cu cele ale icterului posthepatic, fosfataza alcalină serică fiind puţin ridicată.

Icterul prehepatic e determinat de stări hemolitice (bilirubina indirectă, neconjugată).

Icterul neonatal este, parţial, de origine hepatică şi e provocat de capacitatea redusă a ficatutui de a excreta bilirubina în bilă — incapacitatea de a sinteza UDP-GA, dar şi o activitate redusă a glucuronil-transferazei.

Icterul hepatocelular este cauzat de infecţia virală sau toxine. Patogenia icterilor este redată în figura de mai jos (6.67).

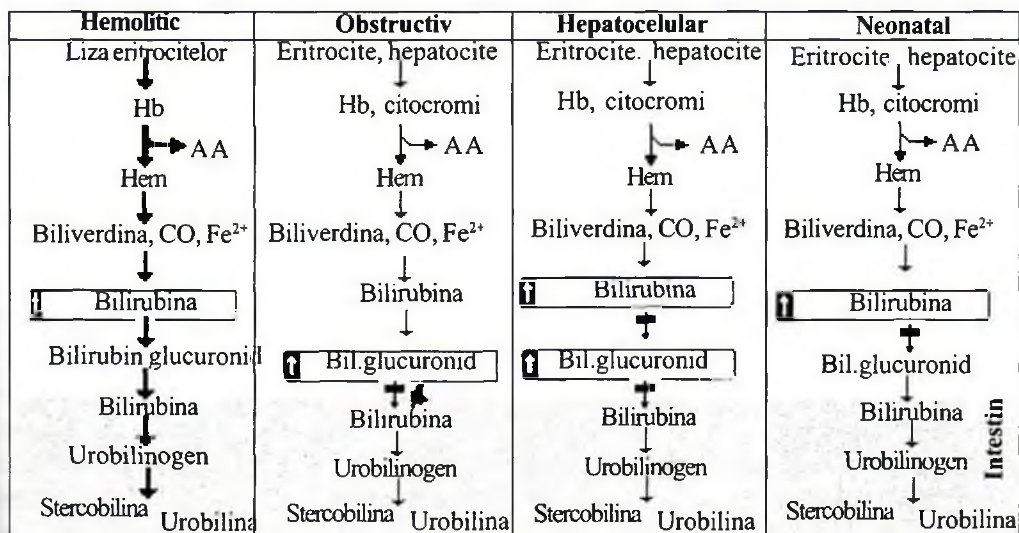


Figura 6.67. ***Patogenia icterilor.*** ▬ ***reprezintă localizarea blocului respectiv***

Icterul juvenil (hiperbilirubinemia familială, sindromul Gilbert) e cauzat de un deficit al proteinei transportatoare de bilirubină, care implicit cauzează deficitul de prelucrare a bilirubinei de către hepatocit. E un icter hepatic premicrozomal, la fel ca şi sindromul *Crigler-Najjar*, provocat de absenţa congenitală a UDP-glucuronil transferazei.

În unele boli genetice (*s.Dubin-Johnson*) se constată defect al secreţiei bilirubinei conjugate din celulele hepatice în canaliculele biliare cu sau fară formarea unui pigment brun (*s.Rotor*).

Sindromul Arias (icter de lungă durată neonatal) este corelat cu prezenţa în laptele matern a unui steroid, inhibitor al conjugării bilirubinei. Bilirubina neconjugată poate conduce la icterul nuclear.

Dintre tulburările metabolice înnăscute se evidenţiază *boala Wilson* (degenerarea hepato-lenticulară), provocată de deficitul sintezei ceruloplasminei (cupru oxidaza), producînd în consecinţă afecţiuni cerebrale (lenticulare), corneene, renale, aminoacidurie, fosfaturie, depozitări de cupru în ţesuturi.

Explorările hepatice se bazează pe cele 4 sindroame proprii patologiei hepatice: excreto-biliar, hepato-priv (insuficienţa celulară), citoliză şi inflamator. Cele mai utilizate probe în diagnosticul ţi pronosticul lor sunt:

1) *Excreto-biliar*: bilirubina şi raportul ei; fosfataza alcalină cu izoenzimele sale; LAP-leucin aminopeptidaza; 5'-nucleotidaza şi γ-glutamil transpeptidaza.

2) *Hepato-priv*: proteinemia totală, albumina serică, factorii de coagulare, colesterolul liber, total şi esterificat, proba QuicK.

3) *Citoliza*: sideremia, cupremia, enzimele plasmatice — SDH, OCT, arginaza, F-1-P aldolaza, guanaza, LDH_5 — indicator de severitate al afecţiunilor şi GLDH (leziuni mitocondriale) GPT, GOT şi raportul lui Schmidt: GOT+ GPT/GDH (glutamat dehidrogenaza) egal cu 5-15 (icter obstructiv), 30-50 (hepatita cronică), 50 (hepatita acută).

4) *Inflamator*: disproteinemia, cu scăderea fracţiei albuminice şi creşterea β şi γ-globulinelor: imunoelectroforetic (creşte IgM — în procese acute şi IgA — în cronice). Se determină şi coeficientul de Rittis (GOT/ GPT), normal egal cu 1,33.

CAPITOLUL VII. SISTEMUL HORMONAL
VITAMINELE

NOŢIUNI GENERALE

Existenţa omului, ca specie umană, e dependentă de posibilitatea lui de a-şi păstra funcţiile vitale şi capacitatea de reproducere. Aceste procese necesită o reglare judicioasă a homeostazei, la care participă diferite sisteme fiziologice – cardiovascular, pulmonar etc. Remiterea informaţiei, coordonarea diferitelor procese necesită sisteme de comunicare intercelulare. Acest rol revine sistemelor nervos şi hormonal, care, fiecare prin mijloacele proprii, dar interdependente, coordonează mesajele diverselor celule. Şi dacă sistemul nervos utilizează transmiţători chimici eliberaţi de extremităţile nervoase din vecinătatea celulelor-ţintă, apoi glandele endocrine elimină hormonii în sînge, în sistemul circulator. Aceste semnale reglatoare sunt transmise la alte ţesuturi-ţintă, potenţial programate pentru interceptarea lor.

Reglarea proceselor intracelulare poate fi atît simplă, cît şi complexă. Reglarea simplă, examinată deja, este determinată de substanţele chimice ce participă la această reacţie – retroinhibiţia enzimelor.

Reglarea mai sensibilă e şi mai complexă, presupunînd participarea unor liganzi reglatori celulari, care nu rezultă din proces şi nici din substanţele direct reglate. Legătura lor vizibilă cu substanţele chimice participante la reacţie e probabilă. Pentru ca acest ligand să se impună efectiv în reglarea complexă e nevoie de modificarea concentraţiei lui în anumite condiţii ale mediului extern care ar crea priorităţi vădite pentru organism. Şi dacă există mecanism de reglare a nivelului ligandului de stimulenţi adecvaţi, devine oportun şi mecanismul efectiv de stimulare a reacţiei respective, ce constă în interacţiunea ligandului cu diverse molecule din celulă.

Evoluţia oferă un reglator-cheie al metabolismului – *AMPc*, un mediator al efectului hormonal şi al semnalelor nervoase ale omului.

Între sistemul endocrin şi cel nervos există multiple interdependenţe, complicîndu-se o dată cu evoluţia organismelor. La etapele anterioare exista o legătură directă între sistemul nervos central, celulele periferice şi neuromediatorii, ce se secretau în vecinătatea celulei-ţintă. Asemenea mecanism persistă ca sistem nervos autonom şi la organismele mai superioare. O dată cu evoluţia speciilor, însă, el devine insuficient pentru asigurarea supravieţuirii speciei. Substanţa produsă de către corpul neuronilor printr-un curent axoplasmic ajunge în extremitatea axonală, eliminîndu-se în sînge şi acţionează asupra unei celule situate la distanţă. Semnalul neurocrin, neurohormon, ce transformă activitatea nervoasă în descărcare hormonală, constituie vasopresina, oxitocina (neurohipofiza) sau catecolaminele stratului medular al suprarenalei. Unele celule cu capacitate de neurosecreţie se deplasează în alte regiuni, păstrîndu-şi capacitatea de neurosecreţie sau de secreţie a peptidelor – mai frecvent în intestinul subţire. Astfel se explică prezenţa *somatostatinei, peptidei intestinale vasoactive, neurotenzinei, substanţei P* în intestin şi pancreas; a granulelor neurosecretoare în bronhii: celulele paracrine (hormoni locali) reglează activitatea celulelor învecinate. Hiperactivitatea lor

cauzează apariția tumorilor hormono-active ale pulmonului, intestinului şi pancreasului.

Complexitatea organismelor necesită crearea unei concentrații substanțiale de hormoni în anumite regiuni, fapt ce determină localizarea glandelor corespunzătoare detaşată de sistemul nervos central. Apar mijloace auxiliare de reglare a acestor glande, ce formează organe producătoare de hormoni intermediari, localizate în preajma sistemului nervos central şi supravegheate de acesta. Astfel, adenohipofiza se postează lîngă sistemul nervos central, ce permite secreției sale hormonale să se afle sub controlul rilizing-factorilor sintetizați de creier.

Procesul evolutiv a condus la formarea şi a altor mecanisme, care au favorizat integrarea sistemului endocrin:

a) au apărut sistemele venoase port (ficat şi hipofizar), ce au permis localizarea efectului hormonal în corespundere cu concentrația şi specificitatea receptorilor tisulari;

b) a fost asigurat gradul diferit de sensibilitate a hormonilor la neutralizare în plasmă, fapt ce joacă un rol primordial în determinarea duratei efectului hormonal. Hormonii secretați în sistemele port au o perioadă mică de înjumătățire. Rezultă o eliminare rapidă şi efectivă a hormonului, în condiții de un surplus al lui în sistemul circulant, contribuind la neutilizarea lui în organe sau celulele-țintă.

Termenul **hormon** a fost utilizat pentru prima dată, în 1904, de către W.Bayliss şi E.Starling pentru a descrie *secretina*, substanță secretată de duoden şi stimulatoare de secreție exocrină a pancreasului. Această lucrare a conturat concepția vitală, conform căreia hormonii:

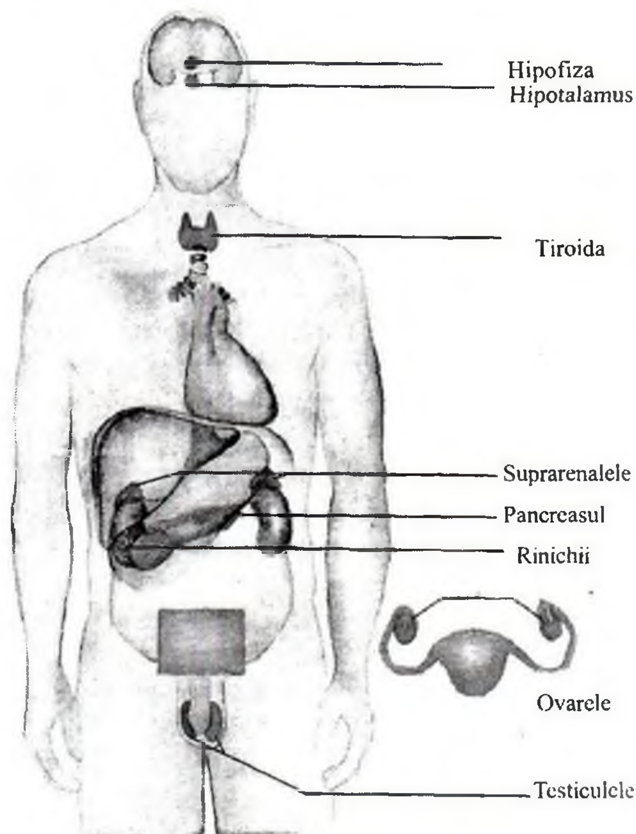
1) sunt molecule sintetizate de țesuturi specializate (glande);

2) sunt secretați direct în sînge;

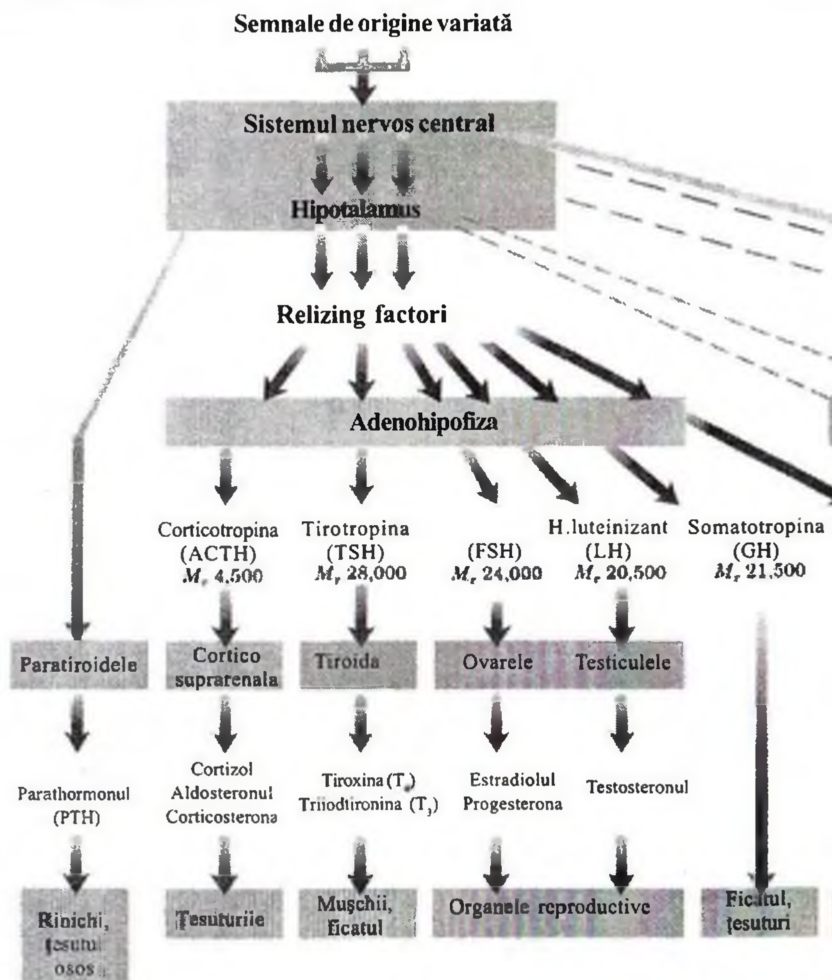
3) modifică specific activitatea unor organe sau celule-țintă.

Hormonii, ca mesageri chimici, coordonează activitatea celulelor într-un organism multicelular.

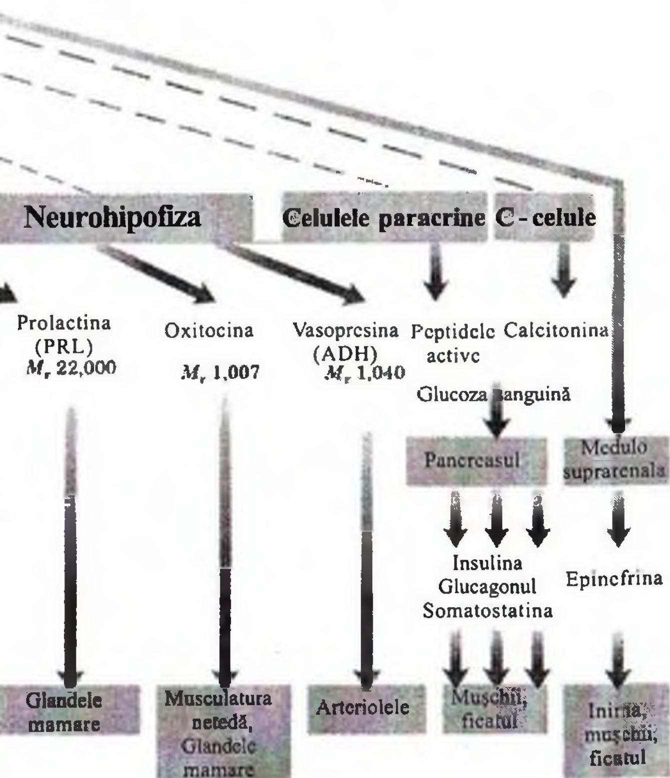
În 1855, Klod Bernard utilizează termenul *glandă cu secreție internă,* ce elimină secreții direct în sînge, fără a dispune de



Glandele majore cu secreție internă



Sistemul endocrin major şi ţesuturile-ţintă

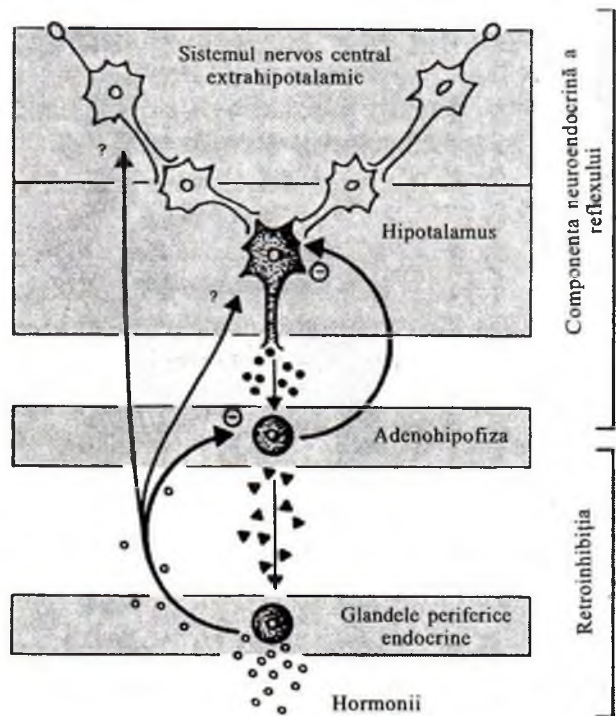

Neurohipofiza
Celulele paracrine
C - celule
Prolactina
(PRL)
M_r 22,000
Oxitocina
M_r 1,007
Vasopresina
(ADH)
M_r 1,040
Peptidele
active
Calcitonina
Glucoza sanguină
Pancreasul
Medulo suprarenala
Insulina
Glucagonul
Somatostatina
Epinefrina
Glandele mamare
Musculatura netedă, Glandele mamare
Arteriolele
Mușchii, ficatul
Inima, mușchii, ficatul

canale corespunzătoare adecvate.

Centrul coordonator al sistemului endocrin este o regiune specifică a creierului – hipotalamusul care recepționează și integrează semnalele din SNC. El elimină hormoni reglatori, care în adenohipofiză (localizată sub hipotalamus) stimulează sau inhibă sinteza unui anumit hormon. La stimulare, hormonii hipofizari, prin sînge, ajung la destinație – la un șir de glande endocrine de alt rang (suprarenale, tiroidă, sexuale, pancreas), care, la rîndul lor, elimină hormoni specifici.

Circulînd prin sînge, sunt captați de receptori specifici, localizați atît în exteriorul, cît și în interiorul celulelor-țintă, care conțin mesageri secunzi, ce transmit semnalul de la receptor la o structură intracelulară specifică, cu funcția de ținta finală în efectul hormonal. Activitatea sistemului endocrin se reglează după legități similare principiului retroinhibiției.

Somatostatina secretată de hipotalamus sau pancreas inhibă secreția tiroliberinei (legătura inversă internă). Activarea diferită a acestor sisteme endocrine e dependentă de o rețea complicată de interlegături reglatoare.



Reglarea feedback a secreției hormonale

Proprietățile comune ale hormonilor

1. Hormonii după structură se împart în trei clase:

a) *hormoni peptidici sau polipeptizi*, conțin pînă la cîteva sute de resturi aminoacidice; resturile terminale sau alte resturi ale aminoacizilor sunt modificate prin prelucrări postraducționale – hormonii hipotalamusului, hipofizei și, de asemenea, insulina, glucagonul, hormonul paratireotrop;

b) *hormoni de structură steroidică* – androgenii, estrogenii, hormonii cortexului suprarenalelor, ușor solubili în lipide;

c) *hormoni compuși hidrosolubili*, cu o masă moleculară mică, ce conțin aminogrupe – catecolaminele și hormonii tireoidieni.

2. Hormonii acționează în concentrații mici, posedînd funcții fiziologice majore. Nivelul bazal în sînge e foarte mic – în limitele 10^{-6} M - 10^{-12} M. Hormonii se identifică și se determină cantitativ foarte problematic. Glandele reacționează la stimulenți printr-o anumită sporire a concentrației – la cota de mii de ori, dar de o durată mică – după finalizarea efectului excitant. Hormonii, imediat ce și-au încheiat funcția, sunt rapid inactivați de enzime.

Catecolaminele şi hormonii peptidici au o perioadă de înjumătăţire de durată mică – cîteva minute, pe cînd cei de natură steroidică şi tireoizii – de la 30 minute la cîteva zile. Acţionînd lent, participă, mai ales, la asigurarea reglării tardive a metabolismului.

Hormonii polipeptidici şi catecolaminele au un efect imediat şi determină inducţia reacţiilor momentan. Adrenalina dilată rapid bronhii, pe cînd glucocorticoizii vor efectua aceeaşi reacţie abia după cîteva ore. De aceea, pentru a asigura modificări urgente şi spontane în cantitatea hormonilor peptidici şi a catecolaminelor, e oportună şi binevenită expulzarea lor rapidă din sînge.

3. Mecanismele de sinteză şi secreţie:

a) Precursorii hormonilor peptidici sunt molecule mult mai mari sintetizate în glandele corespunzătoare, denumite *prohormoni*; uneori, ca rezultat al sintezei ribozomale, se produc proteine şi mai mari – *preprohormoni*. La formarea hormonilor, o importanţă mare o au modificările posttranslaţionale ale produsului primar, care constă din proteoliză şi glicozilare. De obicei, este detaşat capătul N hidrofob al moleculei necesar pentru pătrunderea lui în reticulul endoplasmatic. Drept exemplu servesc modificările preproinsulinei sau preprolactinei, preproparathormonului (fig.7.1).

Este valabilă şi proteoliza de alt tip – ACTH, ce conţine 39 aminoacizi, formîndu-se dintr-un precursor preproopiomelanocortina ce include 285 aminoacizi. În proteoliza

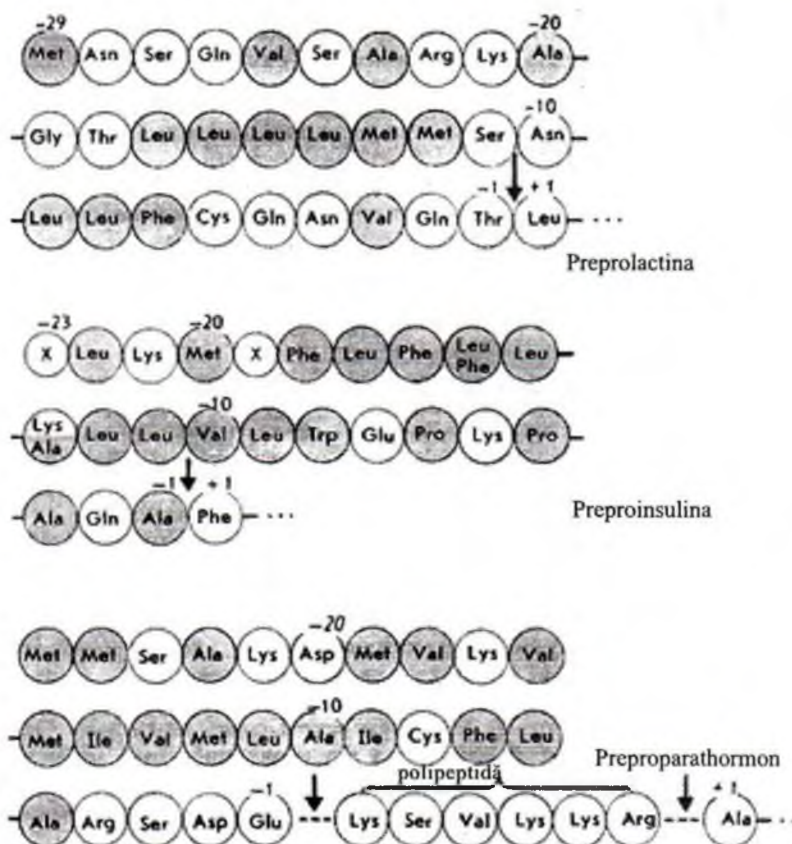


Figura 7.1. ***Precursorii unor hormoni peptidici***

dată se mai formează *β-lipotropina, β-endorfina, encefalinele, A şi B* - hormoni melanostimulatori şi cîteva proteine mai mici. Aşadar, o singură moleculă de mRNA asigură formarea mai multor hormoni.

Unii hormoni, precum sunt ACTH, TSH, FSH, LH etc., se supun glicozilării. Componentul glucidic micşorează viteza degradării hormonului în sînge, mărind durata efectului biologic.

Tema "Enzimele" a elucidat transformările zimogenelor neactive în forme active, unde depozitarea hidrolazelor, în forme neactive, constituie un mecanism de preîntîmpinare a efectului distructiv al enzimelor asupra celulelor care le sintetizează. Atare prudenţă faţă de hormoni este inutilă. Prohormonii reprezintă o formă de rezervă potenţială a hormonilor şi, posibil, o mărturie a evoluţiei, dacă ţinem cont în acest context că unii hormoni de natură peptidică manifestă o activitate biologică intensivă, iar în unele cazuri, drept rezultat al proteolizei specifice, produc un şir de substanţe cu diverse efecte biologice.

Această formă e reprezentativă şi din motiv că unor hormoni (proinsulina, proparathormonul) le este proprie o activitate slabă şi, în condiţii de proliferare a structurii endocrine (adenom), creşte cantitatea lor. Chiar şi prin metode moderne de investigaţii e problematic şi dificil de a-i diferenţia unul de altul (prohormon-hormon), cu consecinţele respective.

Referitor la steroizi. Modificările metabolice iniţiale de colesterol creează posibilităţi pentru formarea androgenilor, exstrogenilor etc. Modificările rezidă în scindări catenare, hidroxilare, reducere, aromatizare. Caracterul hormonului final şi specializarea ţesutului capabil de sinteză e determinat de concentraţia enzimelor, diferită în ţesuturile corespunzătoare. De exemplu, spre finalul sintezei de cortizol se formează şi se elimină în sînge *progesterona, dezoxicorticosterona, corticosterona* etc. De aceea, secreţia de ţesut specific al cîtorva steroizi este o regulă. Dacă se resimte deficitul de enzimă participantă la sinteza hormonală, în sînge sporeşte cantitatea precursorilor ce conduc la modificări nefaste.

Hormonii tiroizi, *tiroxina şi triiodtironina* se sintetizează din *tiroglobulină* – proteină ce conţine aproximativ 5000 aminoacizi cu 120 resturi de tirozină. Grupele fenol sunt iodate diferit, condensate şi după o proteoliză se eliberează T_4 şi T_3. Molecula tirozinei, fiind hidroxilată şi decarboxilată, formează noradrenalina, ultima fiind metilată - adrenalina. În general, glandele endocrine secretă hormonul într-o formă activă în celulele-ţintă. Numai în unele cazuri ea se formează la metabolizarea hormonului în ţesut: testosteronul în ţesutul periferic se modifică la *dihidrotestosteron*, care determină majoritatea efectelor hormonale. Vitamina D, forma activă, este 1,25-dihidroxicolecalciferol. Hormon activ tiroid e T_3, care se formează la monodeiodarea T_4 în ţesuturile periferice.

Mecanismele de secreţie nu sunt suficient studiate. Hormonii se acumulează în acele ţesuturi, unde se sintetizează. Se concentrează în granule formate din reticulul endoplasmatic.

Alipirea hormonilor la membrana celulară provoacă eliminarea lor în sînge (fig.7.2).

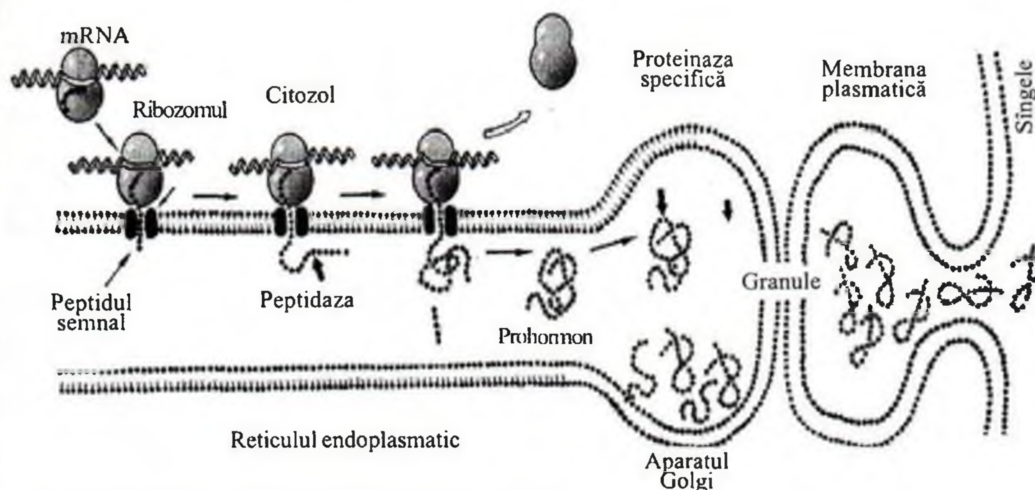


Figura 7.2. ***Schema biosintezei hormonilor peptidici***

4. Majoritatea hormonilor ce circulă prin sînge se fixează de proteinele plasmei. Procesul de fixare nu e decisiv pentru efectul hormonal. Mai activ este hormonul liber, dar nu cel legat de proteine. Procesul de coaptare la proteinele plasmei diminuează efectul hormonal, dar nicidecum nu-l intensifică.

Proteinele cu o afinitate mare față de hormon separă o parte considerabilă din cantitatea acestuia în plasmă. Fixarea nu e rigidă. Cînd solicitarea de hormon crește, are loc disocierea hormonului din acest complex. Hormonii tiroizi se fixează de prealbumină și de o globulină specifică, o altă globulină – *transcortina* – fixează cortizolul.

5. Specificitatea hormonilor față de celulele-țintă e determinată de prezența în celule a unor proteine specifice – *receptorii*, componenți ai membranei celulare. După structură sunt glicoproteide (GP). Specificitatea e asigurată de componentul glucidic al GP. Un rol deosebit îl au și fragmentele glucidice ale gangliozidelor, ce se localizează în bistratul lipidic.

Fiecare hormon are o afinitate mare la receptorul său specific. Unii din hormoni (hidrosolubili) își au receptori în membrana celulară, alții – intracelular. Receptivitatea majoră creează posibilități pentru fixarea hormonului la concentrații foarte mici.

Interacțiunea hormon-receptor este asigurată de forțe slabe, necovalente, iar specificitatea – de complementaritatea sterică a hormonului și a situsului de legare de pe receptor (legarea e reversibilă). Interacțiunea reprezintă un fenomen de saturație. Receptorii se află în stare dinamică, numărul lor e variabil în raport cu diverși factori. Nivelul hormonului reglează numărul de receptori. Hormonii ce au un precursor comun evolutiv (omologi) reglează sensibilitatea celulelor la el - negativ, determinată de micșorarea numărului de receptori (insulina, somatomedina, glucagonul). Acești hormoni le pot reduce sensibilitatea, influențînd asupra componentelor din reacțiile distanțate de receptori. Reacția de acest tip servește drept mijloc de adaptare la un surplus de hormoni, la stimularea glandelor respective. Un exemplu elocvent este rezistența mare a sistemului cardiovascular la surplusul de catecolamine și angiotenzină sau diminuarea sensibilității

țesuturilor periferice la insulină (ca rezultat al micșorării numărului de receptori). Dar și viceversa – *prolactina* provoacă o creștere a numărului de receptori în glanda mamară; angiotenzina mărește sensibilitatea suprarenalelor.

S-a observat și s-a demonstrat că multe țesuturi hormonosensibile se caracterizează printr-un surplus de receptori - «rezervă», ce asigură posibilitatea sporirii sensibilității celulelor-țintă la acțiunea concentrațiilor minime de hormoni. În așa caz factorii-limită se localizează distanțat de receptori. Însă cînd fixarea hormonului și reacțiile biologice sunt corelate perfect, anume atunci receptorii limitează activitatea celulelor.

Complexul *hormon-receptor* poate fi internalizat în interiorul celulei. De regulă, procesul nu e fenomen obligatoriu pentru efectul hormonal, în special pentru hormonii ce activează prin adenilatciclază, dar joacă un anumit rol pentru transferul hormonului în locusul intracelular de acțiune. Asemenea proces contribuie la degradarea hormonilor și receptorilor.

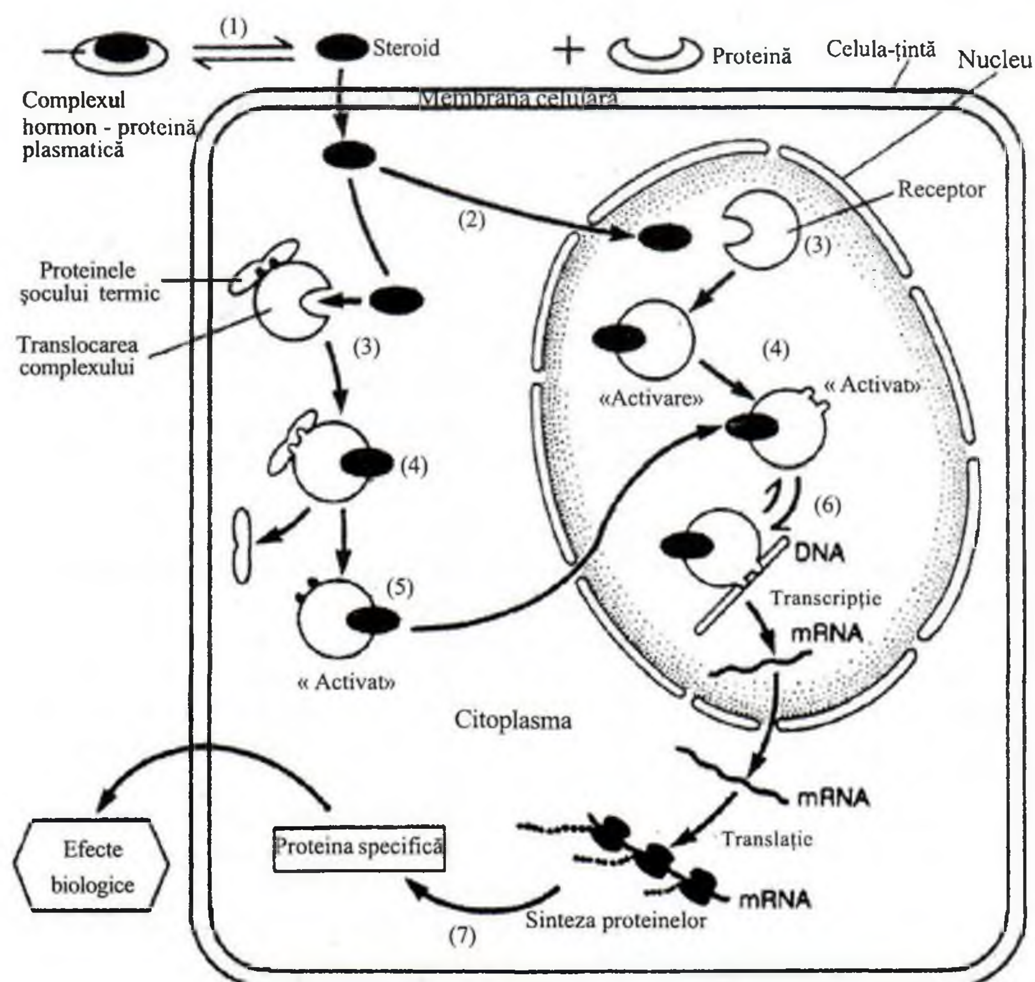


Figura 7.3. ***Mecanismul de acțiune al hormonilor steroizi (posibil și al tiroizilor)***

Hormonii liposolubili pătrund în citoplasma celulei-țintă și se fixează de proteinele citoplasmatice, fiind deosebit de compatibili cu acestea. Interacțiunea hormonului cu receptorii rezultă cu modificări conformaționale ale ultimilor, fapt ce permite legarea cu receptorii nucleici. Aceste complexe sunt transportate în nucleul celulei, unde manifestă compatibilitate deosebită față de cromatină. Locusurile de fixare pe cromatină sunt determinate de fragmentele DNA, însă procesul de fixare e dependent de unele proteine cromozomiale nehistonice. Schimbînd accesibilitatea DNA pentru transcripție, hormonii influențează asupra sintezei mRNA, adică acționează efectiv la nivelul genomului. Steroizii determină inducția sintezei unei proteine noi sau amplifică sinteza celor existente (fig.7.3).

Ce soartă anume are steroidul sau alți hormoni după încheierea funcției nu e limpede.Unii hormoni, cu excepția receptorilor membranari, atestă și locusuri specifice în nucleul celulei – *insulina, tiroxina*, aceștia posedînd cîte două mecanisme de acțiune.Receptorii la tiroxină se manifestă în cromatină, indiferent de prezența sau lipsa hormonului. Reacția la acești hormoni evoluează lent și ei participă la modularea metabolismului, pe o durată lungă.

Mecanismul molecular al acțiunii hormonilor. Mesagerii secunzi.

Sunt atestate trei căi de efecte specifice hormonale:

1. modificări în permeabilitatea membranelor celulare;
2. modificări în viteza reacțiilor fermentative;
3. accelerarea sintezei noilor molecule de enzime.

În studiul mecanismelor de acțiune a hormonilor un rol important îi revine lui E.Sutherland. În anii 50, el studia mecanismul de acțiune a adrenalinei și glucagonului la scindarea glicogenului și formarea glucozei în ficat. Anume lucrările sale au stabilit că fosforilaza se activează la fosforilare și se inactivează la defosforilare (primul exemplu de activare covalentă a enzimelor). S-a demonstrat că efectul hormonal are loc și în homogenatul incelular, anterior se considera că hormonii sunt capabili să acționeze numai asupra celulei-țintă intacte. S-a mai elucidat că nu toate componentele sistemului celular sunt solubile. După centrifugarea homogenatului celular hepatic, reacția de răspuns la hormon dispare, ceea ce denotă că ingredientul esențial al sistemului hormonal este localizat în fracția membranară. Într-adevăr, efectul hormonal se restabilea prin adaosul fracției particulelor subcelulare la supernatant. Acest factor mai e și un activator termostabil. Analiza chimică a demonstrat că este, de fapt, un adeninribonucleotid cu proprietăți neordinare.

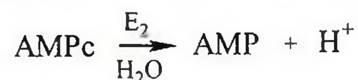
Alt savant, David Lipkin, capată un nou nucleotid din acțiunea hidroxidului de bariu asupra ATP. Acest compus – AMPc sau adenozin-3',5'- monofosfat – se formează în celulă din ATP, sub acțiunea enzimei membranare *adenilatciclazei* (E_1).



$$ATP \xrightarrow[Mg^{2+}]{E_1} AMPc + PP_i + H^+$$

Drept sursă pentru sinteză serveşte hidroliza pirofosfatului.

O *fosfodiesterază* (E_2) specifică scindează AMPc, hidrolizînd-o la AMP.



$$AMPc \xrightarrow[H_2O]{E_2} AMP + H^+$$

Este o reacţie cu nivel de energie liberă evoaluată la 12 kcal/mol. În absenţa fosfodiesterazei, AMPc este un compus foarte stabil.

Investigaţiile lui E.Sutherland au permis acceptarea concepţiei despre rolul AMPc ca mesager secundar al mecanismului de acţiune a unor hormoni, unde drept prim mesager e considerat însuşi hormonul. Sensul concepţiei lui Sutherland constă în următoarele:

1) membranele plasmatice celulare conţin receptori la hormoni;

2) interacţiunea hormonului cu receptorul specific stimulează adenilatciclaza la fel fixată pe membrană;

3) ca rezultat al activării ei în celulă, sporeşte concentraţia de AMPc;

4) efectul AMPc se produce în interiorul celulei şi rezidă în modificările de viteză a unui sau a mai multor procese.

Particularitatea esenţială a acestei ipoteze constă în faptul că nu presupune transferul hormonului în celulă. Efectul se limitează la membrana celulară. Concepţia a fost experimental argumentată de mai mulţi savanţi. AMPc e mesager secundar nu numai la acţiunea adrenalinei şi glucagonului, dar şi a altor hormoni ca: ACTH, FSH TSH, LH, noradrenalina (NA), parathormonul, calcitonina etc. De altfel, AMPc se implică efectiv în multiple procese biologice.

Cum anume are loc *procesul de interacţiune dintre hormon şi receptor,* în urma căruia se produce o activare a moleculei adenilatciclazei? Locusurile de fixare a hormonilor sunt situate pe partea exterioară a membranei, pe cînd locusurile catalitice ale adenilatciclazei sunt orientate spre citozol. Acestea constituie proteine diferite ce se pot separa prin centrifugare. Fixarea e determinată de interacţiuni hidrofobe şi electrostatice. Hormonul capătă înainte de fixare o anumită conformaţie tridimensională pentru insulină şi spiralată – pentru glucagon etc.

Complexul hormon-receptor influenţează considerabil asupra adenilatciclazei (AC), deşi nu direct, ci printr-un intermediar, mai bine zis prin diferite proteine intermediare, denumite *G-proteine* ce fixează guanin nucleotidele. Aceste proteine reglatoare pot fi active şi inactive şi în ultimii ani li se acordă o atenţie sporită. G-proteinele sunt situate în partea internă a membranei plasmatice. Molecula e compusă din trei subunităţi – catene polipeptidice cu valoare (mărime) descrescîndă α, β, γ. În toate G-proteinele separate α subunităţile sunt diferite, β şi γ – nu neapărat specifice. La diverse α subunităţi pot fi aceleaşi sau diferite β şi γ perechi. Sunt descrise 5 tipuri structurale β şi mai mult de 10 tipuri γ, ce pot conferi mai bine de 1000 de combinaţii.

Cum G-proteina îşi realizează funcţia? În stare de relaxare, subunităţile formează un complex, unde GDP e fixat de α-subunitate. La fixarea unui mesager primar de receptor, conformaţia ultimului se modifică, legîndu-se cu G-proteina. Ca rezultat al acestei interacţiuni, α-subunitatea eliberează GDP. GTP, fiind în concentraţie mai mare,

ocupă locusul de legătură eliberat şi modifică forma subunității α, activînd-o. Deja activată şi fixată cu GTP, α subunitatea se desprinde de complex şi, prin difuzie, se deplasează pe partea internă a membranei plasmatice pînă la fixarea cu efectorul, de exemplu, cu adenilatciclaza. În mod normal, peste cîteva secunde α-subunitea hidrolizează GTP la GDP şi se inactivează, apoi succesiv se desprinde de la efector şi se asociază cu subunitățile β şi γ libere (fig.7.4).

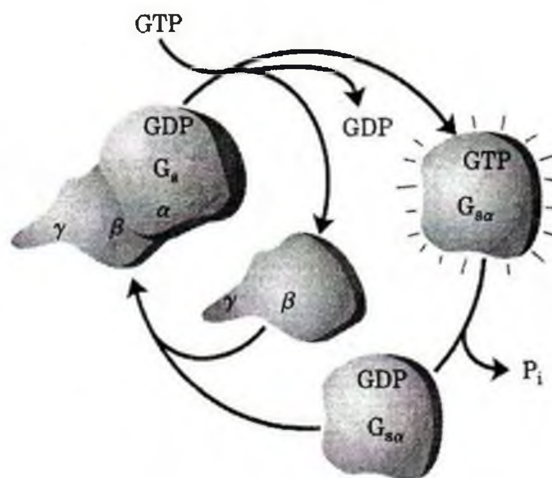


Figura7.4. *Ciclul de activare şi inactivare a proteinei Gs*

Aşadar, G-proteinele servesc drept comutatori, precum şi ca timeri ce stabilesc momentul şi timpul activității căilor de semnalizare. Durata de timp e determinată de viteza de hidroliză a GTP.

G-proteinele posedă capacitatea de a amplifica semnalele. Hidroliza GTP e reglată şi de proteinele ce nu participă la transmiterea semnalelor. Aceste proteine, împreună cu transmițătorii de semnale, formează superfamilia GTP-azelor care participă la sinteza proteinelor şi la reglarea vitezei mitozei celulare. Rolul - cheie îl joacă subunitatea α. Apare întrebarea: oare perechile β şi γ participă în reglarea efectorilor? Se profilează ideea că şi complexul β–γ funcționează ca un tot întreg în procesul de transmitere a semnalelor: pe unele le activează, pe altele le inhibă, datorită interacționării cu diferite G-proteine. Precum se constată, are loc un schimb de subunități (fig.7.5).

Metoda cristalografiei cu raze X oferă posibilitatea studierii locusurilor de interacțiune moleculară. S-a stabilit că în molecula receptorilor ce interacționează cu G-proteinele, se conțin 7 locusuri bogate în aminoacizi hidrofobi, care formează o pungă de captare a mesagerilor primari. Unele porțiuni ale receptorilor, ce ies la citozol şi racordează locusurile hidrofobe, reprezintă nişte inele, ce se unesc cu G-proteinele specifice. Ultimele n-au locusuri hidrofobe puternice. S-a constatat că γ-subunitatea se asociază cu o moleculă lipidă-izoprenoidă, pe cînd α-subunitatea se fixează în membrane cu ajutorul acidului miristinic. Aceste lipide acționează ca nişte ancore, fixîndu-le (G-proteine) în membrană. Sunt atestați şi indicii referitori la conformația şi structura adenilatciclazei: are 12 locusuri transmembranare ce formează un canal pentru transferul ionilor, posedă 2 domenii hidrofile orientate spre citozol, necesare pentru sinteza AMPc. Capacitatea receptorilor, G-proteinelor, efectorilor de a interacționa cu diferite molecule intracelulare conferă celulei, la diferite etape, proprietatea de a alege efectul respectiv din multiplele căi potențiale de transmitere a semnalului. Posibil că membrana celulară reprezintă un sistem de comutare a variatelor semnale din mediu, ceea ce determină diferiți mesageri să se ralieze la recepționarea specifică de către celule a modificărilor din mediul extern (fig.7.6).

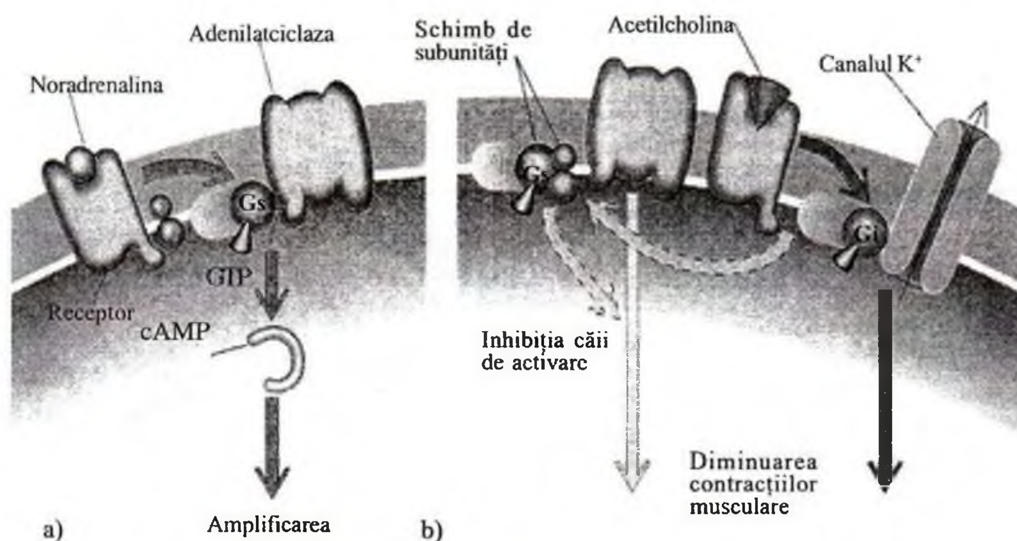


Figura7.5. ***Amplificarea căii de transmitere a semnalului în mușchiul cardiac (a) poate fi parțial inhibată de schimbul de subunități (b). Contracțiile se majorează la activarea proteinei Gs de α-subunitate. Contracțiile diminuează cînd α-subunitatea din proteina C_i deschide canalul de K^+, ultimul părăsind celula. Schimbul de subunități conduce la diminuarea contracțiilor, dacă β și γ subunitățile proteinei G_i suntasociate cu α-subunitate din Gs, se blochează efectul asupra adenilatciclazei.***

Studierea mecanismelor de transfer al semnalelor transmembranare are o importanță practică evidentă.

Vibrionul de holeră, pătrunzînd în celulele intestinului, blochează α-subunitatea a Gs-proteinei (ADP-ribozilare), astfel GTP nu se hidrolizează în GDP. În celule se acumulează AMPc, ce cauzează o eliminare în lumenul intestinal a unei mari cantități de apă și electroliți (Na), favorizînd dehidratarea și deionizarea organismului.

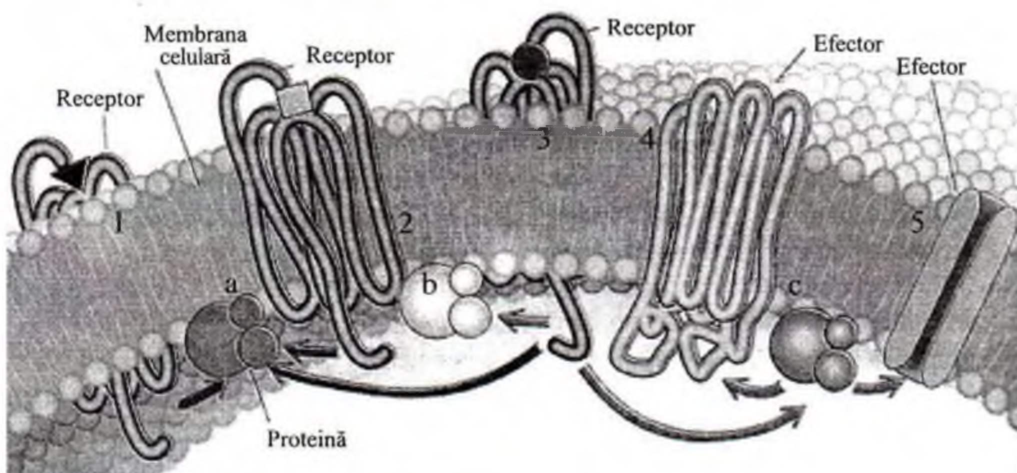


Figura 7.6. ***Membrana celulară. Reprezintă un sistem de comutare compus, conform necesităților celulare. Semnalele transmise prin diferiți receptori (1, 2, 3) au același efect, dacă activează aceeași G-proteină a; semnalul transmis prin receptorul 3 produce diferite efecte, dacă activează diferite G-proteine (b,c), sau G-proteina c activează diferiți efectori (4, 5).***

O toxină asemănătoare elimină şi bacilul *tusei convulsive*. Toxinele atacă celulele, provocînd imunodeficitul însoţit de o tuse caracteristică. La maladiile cancerigene un rol decisiv îl au formele *mutante de G-proteine* (tumori ale hipofizei); în gena ce codifică α subunitatea sunt depistate mutaţii şi, ca rezultat, interacţiunea ei cu efectorii are loc timp de minute, dar nu de secunde, ceea ce provoacă o înmulţire intensivă. Se studiază rolul G-proteinelor la depresia psihică, insuficienţa cardiacă, diabet.

Interacţiunea hormon-receptor pînă în prezent nu e studiată definitiv. După eluţie, hormonul îşi păstrează proprietăţile sale biologice active. O parte din acest complex poate fi internalizat şi supus degradării sub acţiunea enzimelor lizozomale. La o eventuală disociere incompletă, parvine o ocupare a receptorilor, cauzînd potenţial o pierdere funcţională a receptorilor, adică o micşorare a locusurilor de fixare a hormonilor.

Desemnarea *AMPc ca substanţă reglatoare* are o istorie evolutivă evidentă. La bacterii ea serveşte ca un semnal al foamei şi al lipsei de glucoză, conducînd la sinteza altor enzime, cu utilizarea altor surse de energie. La mamifere îşi păstrează funcţia tradiţională, dar mai stimulează şi proteinkinazele. La organismele superioare e mesageră în procesele intracelulare.

Care-i cauza transformărilor: de la comunicaţia extracelulară la mesager intracelular? Presupunem că un rol deosebit aici l-au avut următorii factori:

1. AMPc în totalitate se formează din ATP, ca rezultat al unei reacţii simple în baza hidrolizei de pirofosfat.

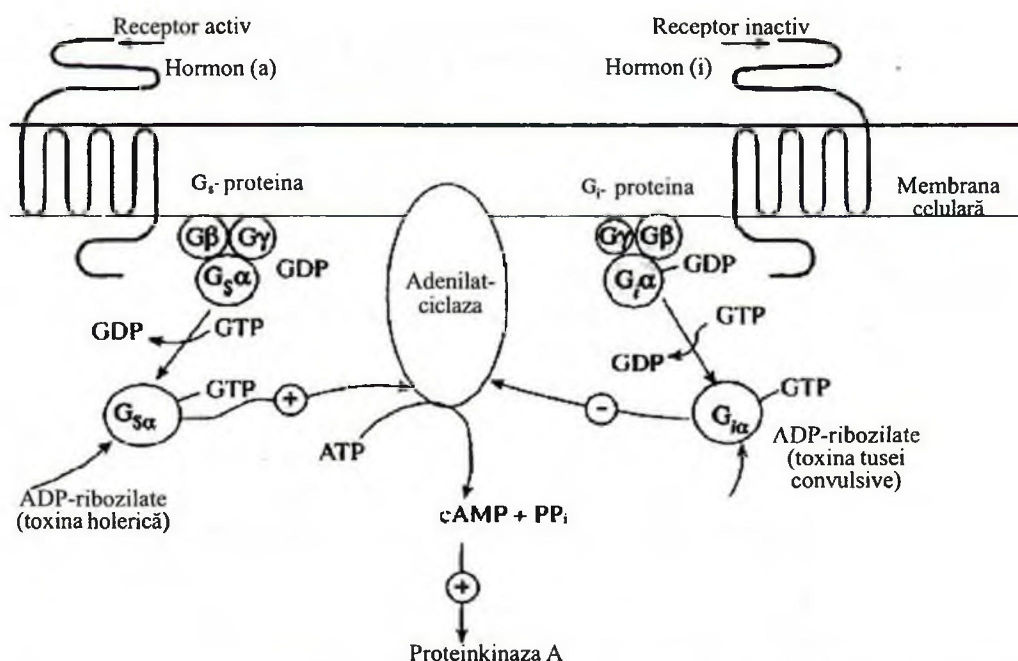
2. Fiind un derivat şi ocupînd un rol central în transformările metabolice, ea însăşi se postează departe de căile principale ale metabolismului. E un integrator al metabolismului, dar nu participă nici la biosinteză, nici nu e produs intermediar în metabolismul energetic. De aceea concentraţia ei se reglează univoc.

3. Posedă destule grupe funcţionale ce permit fixarea rigidă şi specifică cu proteinele receptorice, rezultînd efecte corespunzătoare alosterice.

Utilizarea AMPc ca mesager secundar amplifică semnalul hormonal. O moleculă activă de *adenilatciclază* (AC) sintetizează mai multe molecule de AMPc. *Proteinkinaza* activată de AMPc fosforilează multe molecule proteice. De aceea, cantităţi minime de hormoni (10^{-10}) pot modifica esenţial metabolismul celulei. În figura ce urmează este ilustrat mai clar controlul dublu al activităţii adenilatciclazei de G-proteine.

În sistemul transductor al semnalelor hormonale un rol deosebit îl au proteinkinazele – enzime ce fosforiliază proteinele la resturile de serină, treonină sau tirozina. Defosforilarea proteinelor e catalizată de fosfataze. Deosebim fosfataze receptorice şi intracelulare. Cele receptorice posedă un domen extracelular. Toate proteinazele formează un *kinom*. În *proteoma* omului sunt depistate peste 518 proteinkinaze, ce prezintă aproximativ 2% din proteinele codificate de genom. 92% din ele aparţin unei superfamilii compuse din 7 clase. Proteinkinazele sunt considerate cele ce fosforilează resturile de serină şi treonină (82%), iar cele ce fosforilează tirozina sunt denumite *tirozinkinaze* (18%).

Ca substrat pentru porteinkinaze servesc enzimele, canalele ionice, factorii de translaţie, transcriere, proteinele structurale şi altele.



Controlul dublu al activității adenilatciclazei de proteinele G. Subscriptul a și i denotă activarea sau inhibiția proceselor

Procesul fosforilare-defosforilare este un mecanism universal de reglare a metabolismului. În țesuturi a fost identificat un număr mic de forme de bază ale proteinkinazelor ce nu explică efectele multiple ale AMPc. De aceea, specificitatea reacțiilor de fosforilare este determinată de localizarea și caracterul substratului proteic. Subunitățile catalitice în toate proteinkinazele sunt identice, pe cînd cele reglatoare au particularități individuale. În lipsa AMPc, se formează holoenzima neactivă. S-a constatat că reacțiile de fosforilare au o specificitate mare cu referință la serina depistată în anumite fragmente ale secvențelor aminoacidice din proteine. Substratul ce solicită o fosforilare conține doi aminoacizi bazici situați în apropiere – unul e arginina localizată la 2-5 resturi de aminoacizi de la serina fosforilată la capătul N-terminal.

Specificitatea altor proteine, ca substrat de fosforilare, poate fi determinată de conformația secundară sau terțiară, care reduce din fragmentele potențial fosforilate pentru subunitatea catalitică a enzimei.

Un alt sistem transductor al semnalelor externe în mesageri intracelulari este compus din *fosfolipaza C* ce acționează asupra lipidelor membranare, generînd *diacilglicerol și inozitol-1,4,5- trifosfați*. Simultan, se mai formează o cantitate minoră de formă ciclică IP_{3c}(4,5), cînd în reacție ia parte grupa OH din poziția 2 a inozitei. În condiții fiziologice, cota acestui izomer ce se acumulează la acțiunea hormonului poate atinge 30% din nivelul IP_3(1,4,5). Sunt caracterizate mai multe izoforme de fosfolipaze C, unde fiecare în parte poate hidroliza toate fosfoinozitidele (3), cu formarea următorilor compuși: neciclici IP, IP_2(1,4), IP_3(1,4,5) și trei ciclici – IP_c(1:2), IP_{2c}(1:2,4), IP_{3c}(1:2,4,5).

În condiții fiziologice, fosfolipaza C(PLC) scindează preponderent PIP(4) și PIP_2(4,5), utilizînd pentru hidroliza lor concentrații submoleculare (10^{-7}M) de Ca^{2+} –

nivelul normal ce se află în citozol. Masa moleculară a *izoformelor PLC* se află în diapazonul de la 60 la 150 kDa, unde unele forme sunt libere în citoplasmă, altele sunt fixate rigid de membrana plasmatică. Toate izoformele se deosebesc vădit după structura primară şi au în aceeaşi poziţie un domen analogic, cu aproximaţie de 250 aminoacizi. Fiind foarte conservativ, acest domen presupune prezenţa sa în formarea centrului catalitic. Interacţiunea formelor PLC cu membranele se realizează prin intermediul G-proteinelor sau a receptorilor membranari.

Prezenţa izoformelor multiple e cauzată de faptul că enzima conduce efectul multor agonişti. β forma este activată de hormoni, receptori care sunt cuplaţi cu G-proteinele. Este stabilit că mai mult de 30 de receptori îşi au efectul prin activarea β izoformei PLC (fig.7.7).

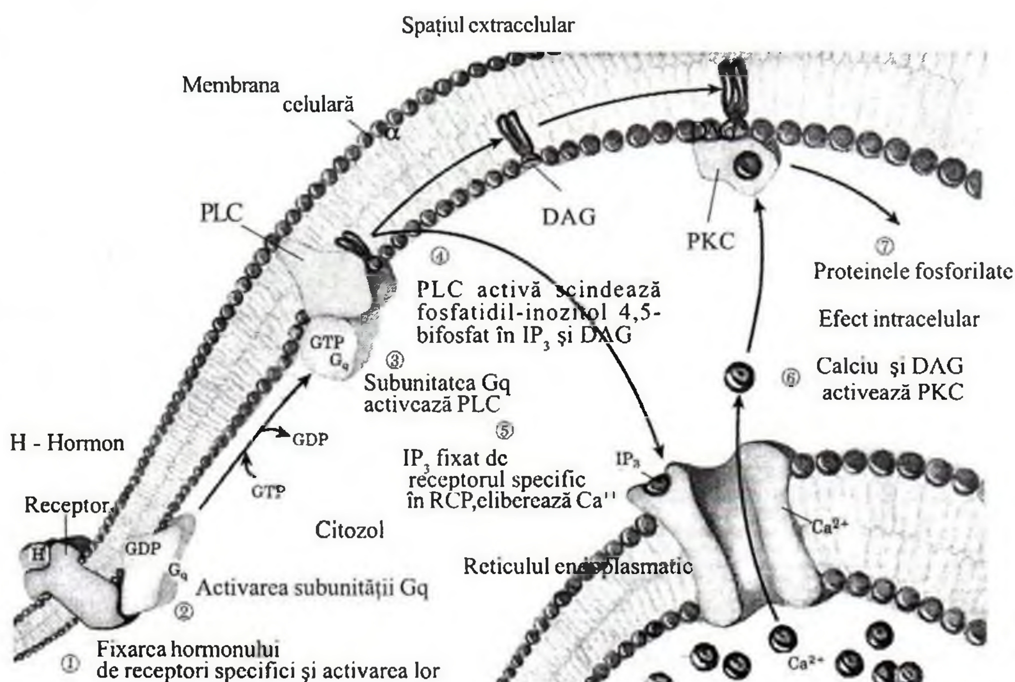


Figura 7.7. ***Rolul inozitol trifosfaţilor în semnalizarea intracelulară***

Aceşti receptori se referă la proteinele membranare cu 7 domeni transmembranari: α-1–adrenergice; M-1, M-3, M-5–muscarin colinergice; P_{2i} şi P_{2y} – purinergice; 5HT–serotoninergice; Vi_a şi Vi_b – vasopresinice; H_1 – histaminice ş.a.

Receptorii la factorii de creştere diferă după structură de cei hormonali. Ei transferă o singură dată membrana şi duc un domen în partea citozolică, ce posedă funcţie tirozinkinazică.

Fosfolipaza C este o *proteină fixatoare de* Ca^{2+} care posedă ca şi alte proteine similare EF-domen, ce determină o afinitate majoră de legare a Ca^{2+}.

Micşorarea Ca^{2+} în citoplasmă, cît şi dofamina (activează canalele K^{+}), AMP_c, GMP_c, care micşorează nivelul Ca^{2+} în citozol blochează metabolismul inozitolfosfaţilor. Şi dimpotrivă, majorarea Ca^{2+} în citozol pînă la 10^{-6}-10^{-5} M, îl activează. Aşa mecanism e posibil la stimularea oxidării peroxidice a lipidelor, distrugerea membranelor, acţiunea Ca-inoforilor, cît şi altele.

Trigherul cardinal în oscilaţiile calciului este *IP_3(1,4,5),* ca rezultat al activării PLC. IP_3(1,4,5) difuzează de la membrana plasmatică, unde se formează la membranele reticulului endoplasmatic în zecimi de secunde. Cantitatea şi concentraţia IP_3(1,4,5) este suficientă ca să ocupe toate moleculele receptorilor specifici, însă iese Ca^{2+} numai din unele porţiuni (focare active).

Receptorul la IP_3(1,4,5) prezintă un tetramer compus din aceleaşi subunităţi, ce formează *o piră* nespecifică pentru cation. Fixarea inozitfosfatului este cooperativă cu receptorul şi se finalizează cu desensibilizarea – micşorarea sensibilităţii receptorului la agonistul său. Acest canal poate fixa ATP-ul şi poate fi fosforilat de proteinkinaza AMP_c dependentă. Focarele active apar în corelaţie cu concentraţiile locale mari de Ca^{2+}, inozitoltrifosfaţi sau ale receptorului respectiv. Ca^{2+}, în continuare, difundează pe RE şi majorează sensibilitatea receptorului la IP_3(1,4,5), favorizînd transmiterea undei de Ca^{2+}. Majorarea Ca^{2+} local inactivează canalul respectiv, ca rezultat porţiunea activă se strînge, Ca^{2+} difundînd, generează alte porţiuni de eliminare a Ca^{2+} din reticulul.

Reglează nivelul de Ca^{2+} şi IP_4(1,3,4,5), care activează torentul din exterior în celulă şi depozitele intracelulare. Se presupune rolul de bufer al acestui compus, din care se restabilesc rezervele de IP_3(1,4,5), mesager secund, mobilizator al Ca^{2+}.

Un component esenţial al sistemelor de comunicare e şi *Calciul-mesager* intracelular, ce reglează contracţia tuturor formelor de muşchi, secreţia produselor exo-endo-neurocrine, proliferarea celulară, cu transcripţia genelor.

În membranele celulare funcţionează structuri ce asigură intrarea Ca^{2+} în citozol după gradientul de concentraţie, utilizînd energia ATP (pompa de Ca^{2+}) sau gradientul altor ioni (Na/Ca). Funcţionarea concordată a ambelor sisteme de transport al Ca^{2+} prin membranele citoplasmatice şi intracelulare determină majorarea tranzitorie a concentraţiei de Ca^{2+}. *Intensitatea oscilaţiei concentraţiei citoplasmatice de Ca^{2+}* e dependentă de produsele hidrolizei fosfatidilinozitolilor şi creşte sub influenţa stimulatorilor extracelulari (hormoni, factori de creştere, excitanţi mecanici celulari).

Unda oscilaţiilor de Ca^{2+} se răspîndeşte de la nucleu şi poate avea formă de sferă sau spirale compuse. În unele ţesuturi (miocard, creier, endoteliu) oscilaţiile apărute într-o celulă provoacă asemenea oscilaţii şi în vecinătatea sa, cu aceeaşi intensitate. Unda e transmisă prin contactele intercelulare, care posedă o conductibilitate deosebit de mare pentru ioni.

Efectul reglator asupra sistemelor enzimatice e asigurat de fixarea lui de o proteină mică (M) denumită *calmodulină* şi are o funcţie intermediară de control al Ca^{2+} în activitatea enzimelor din ţesuturi (fig.7.8).

Calmodulina are aceeaşi secvenţă aminoacidică la toate speciile de animale, fiind o proteină foarte conservativă, cu o sensibilitate mare la Ca^{2+}. Posedă 4 locusuri de

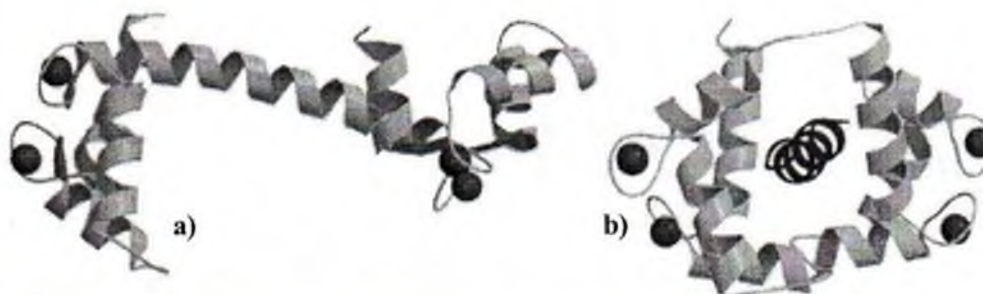


Figura 7.8 ***Calmodulina. Proteină mediatoare a multor reacții enzimatice stimulate de Ca^{2+}, calmodulina are 4 locusuri de legare, cu înaltă afinitate pentru Ca^{2+} (Kd aproximativ 0,1 pînă la 1μM). a) Un model schematic al structurii cristalice a calmodulinei; toate locusurile de legare cu Ca^{2+} sunt ocupate (bilele); domeniul aminoterminal este la stînga, domeniul terminal carboxil este la dreapta; b) Calmodulina asociată cu un domen helical (spirala) al uneia din multele enzime pe care le reglează - proteinkinaza II calmodulin-dependentă. E de notat că helixul α central lung vizibil în a) s-a legat din urma lui, la domeniul substratului helical***

fixare a Ca^{2+}, saturația cărora modifică conformația proteinei, conferindu-i o configurație de α-spirală, ce reglează sisteme enzimatice dependente de el. În creier, conform investigațiilor din ultimul timp, a fost separată o altă proteină, ce fixează calmodulina și inhibă fosfodiesteraza, fiind un reglator nou în homeostazia Ca^{2+}.

Un act primar în aceste reacții celulare este transferul calciului în citozol din mitocondrii, microzomi sau din lichidul extracelular, unde concentrația lui este mare. Calmodulina eliberează ușor ionii de Ca^{2+}, căpătînd conformația inactivă și disociindu-se de proteină.

Concentrația calciului, ca și a AMPc, reflectă echilibrul dinamic dintre apariția și dispariția semnalului. Diferiți mesageri intracelulari pot interacționa reciproc. Studiile din ultimii ani atestă complicarea vădită a modelului de relații reciproce dintre mesageri. Același hormon, acționînd asupra unor receptori de tip similar, poate provoca intensificarea torentului de Ca^{2+} în celulă, precum și a concentrației AMPc. Multiplele efecte ale calciului și AMPc sunt realizate prin același mecanism – reglarea și activarea proteinkinazelor. Schema clasică nu poate reproduce mecanismul reacțiilor de lungă durată ale celulelor, însoțite permanent de semnale extracelulare. Și dacă pentru AMPc atare mecanism e efectiv, apoi concentrația Ca^{2+}, la interacțiunea acestor semnale, se amplifică la intervale mici de timp (1 min.), apoi revine la inițial, dacă reacția celulară durează cîteva ore.

Evident că rolul de mesager în *reacțiile de durată lungă* îl joacă circularea Ca^{2+}, blocajul acestuia determină o reacție de scurtă durată. Procesul circulant al Ca^{2+} în membrană sau în apropierea ei devine un mesager important (fig.7.9).

S-a confirmat că fixarea semnalului Ca^{2+} și preschimbarea lui în forma ce modifică procesele celulare necesită un mesager – proteină sensibilă la Ca^{2+}, asociată cu membrana. S-au depistat mai mulți de acest fel, dar incită un interes deosebit - *proteinkinaza C* - enzimă ce reglează funcția pompei de Ca^{2+}.

Cele două scheme alăturate ilustrează clar modul de transmitere intracelulară a semnalelor. Particularitatea esențială a schemei de transmitere intracelulară a semnalului

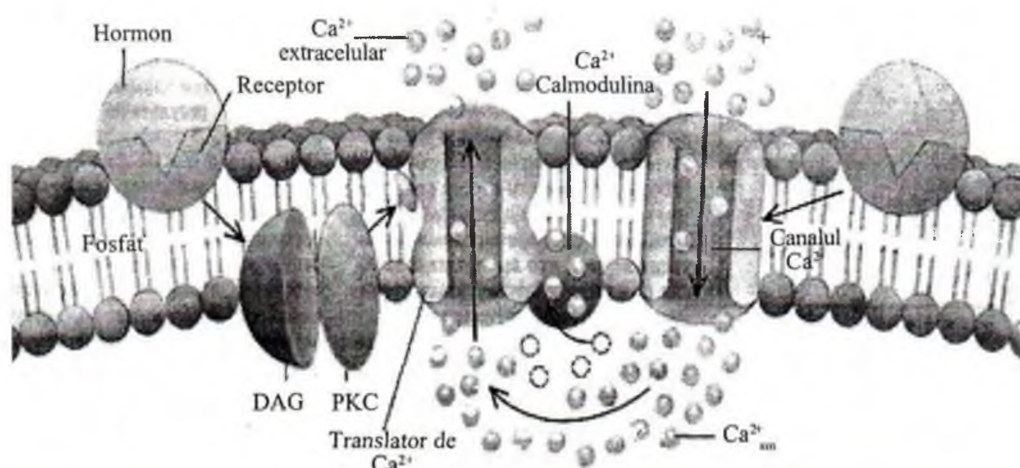


Figura 7.9. ***Autoreglarea circuitului de Ca^{2+}. Torentul de Ca^{2+} în celulă prin canalele membranare se majorează la interacţiunea hormonului cu receptorul său. Creşterea Ca^{2+} în regiunea premembranară (Ca^{2+}_{sm}) activează calmodulina ce fixează Ca^{2+} şi PKC. Ultimele, în ansamblu, activează translatorul de Ca^{2+} şi în consecinţa se echilibrează torentul de Ca^{2+} intra şi extra celulă. Circulaţia Ca^{2+} măreşte concentraţia sa în zona premembranară, ce prezintă semnal de Ca^{2+} pentru DAG.***

constă în prezenţa indispensabilă a două căi separate în timp, unde Ca^{2+} îndeplineşte funcţia de mesager secundar. În reacţia primară se activează calea prin calmodulină, unde majorarea de scurtă durată a Ca^{2+} în citozol, determinată de IP_3, acţionează asupra proteinkinazei activate de calmodulină, la care se activează o grupă de proteine celulare, ce determină reacţii celulare, cu secreţia aldosteronului (fig.7.10).

A doua cale, cu participarea *proteinkinazei C*, se realizează în fază prolongată, unde majorarea concentraţiei de calciu în regiunea premembranară activează, asociată

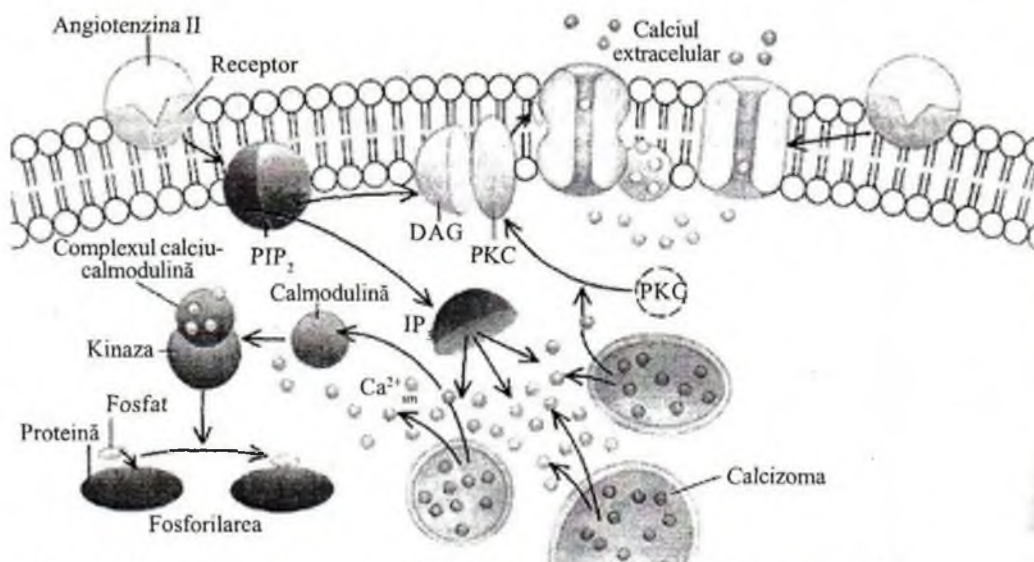


Figura 7.10. ***Activarea celulelor zonei glomeruloza a suprarenalelor de angiotenzina II. Prima cale de acţiune a Ca^{2+} în calitate de mesager secund în reacţia celulară***

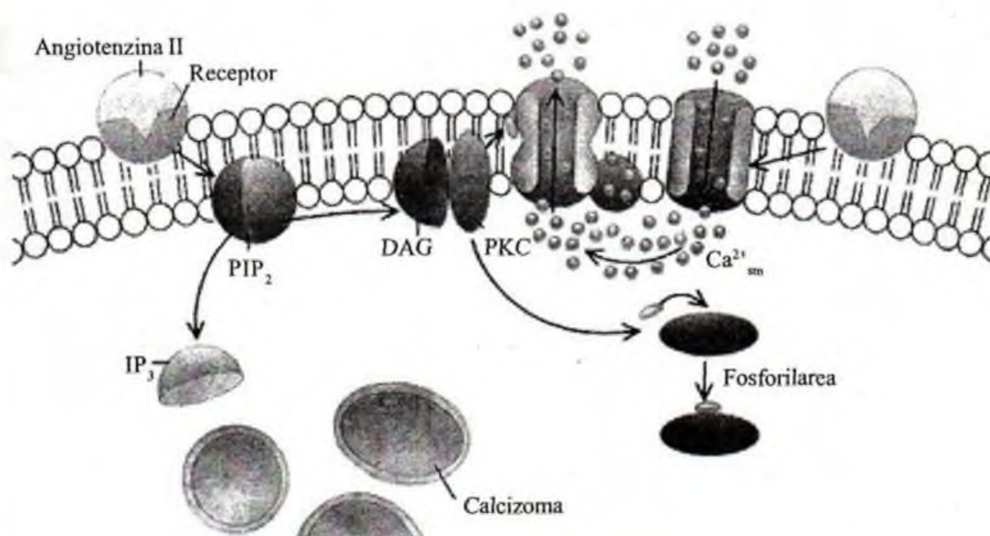


Figura 7.11. ***În faza prolongată a reacției celulare, angiotenzina II provoacă o amplificare a circulației Ca^{2+} prin membrana plasmatică***

cu membrana, proteinkinaza C, ulterior fosforilează proteinele, ce determină durata reacțiilor celulare. Avalanșa kinazelor determină efectul proteinkinazei C, care nu părăsește membrana plasmatică. Alte kinaze active sunt capabile să fosforileze substraturile, să intensifice activitatea diferitelor enzime, influențînd asupra proteinelor-țintă (fig.7.11; 7.12).

E valabilă o astfel de schemă și pentru stimularea secreției insulinei de β celule, contracția musculaturii netede, la care acțiunea de mesager a Ca^{++} se interferează cu activitatea AMPc.

La eliberarea receptorilor de hormoni, adenilatciclaza devine inactivă, iar formarea de AMPc se întrerupe. AMPc deja creat este degradat de o enzimă fosfodiesterază ce hidrolizează 3' legătura fosfat, cu formarea 5'-adenozinmonofosfatului liber. Consecutiv, are loc eliberarea AMPc din subunitățile reglatoare ale proteinkinazei, fapt ce duce la asocierea lor cu asamblarea în holoenzimă.

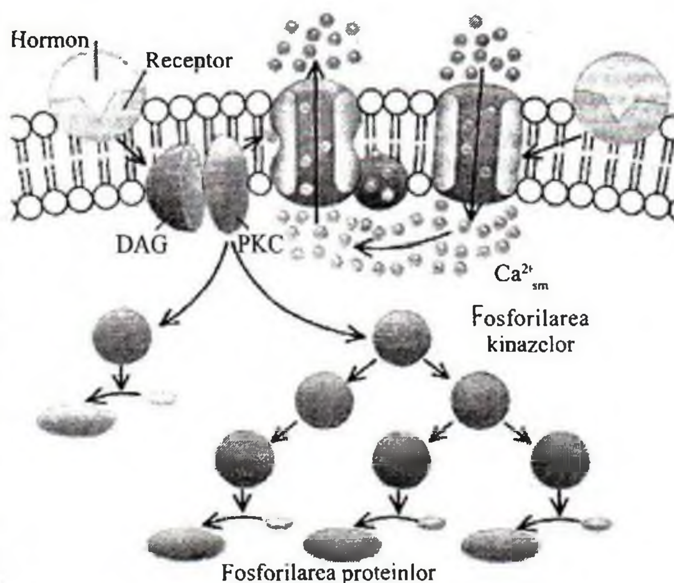
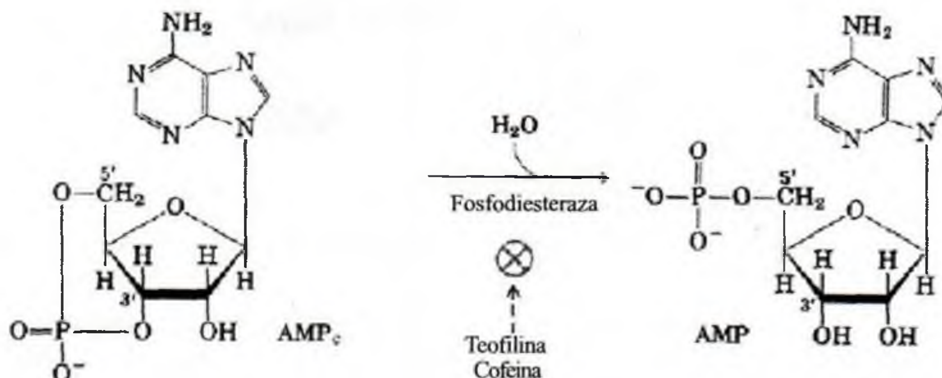


Figura 7.12. ***Avalanșa kinazelor determină efectul activării proteinkinazei C ce nu părăsește membrana plasmatică***

Activitatea *fosfodiesterazei* este ușor stopată de cofeină și teofilină – alcaloizi de cafea și ceai. Acești al-

caloizi prolonghează şi amplifică efectul adrenalinei, micşorînd viteza de scindare a AMPc. În ţesuturi fosfodiesteraza (FDE) este dinamizată de ionii de Ca^{++}. *Complexul Ca^{++}- calmodulin* - se ataşează de FDE şi o stimulează. Fosfodiesteraza este inhibată de *ciclomilast, piclamilast* – antiinflamatoare utilizate în tratamentul artritelor, astmului bronşic. Este un inhibitor al FDE şi *viagra* (*sildenafil*) ce provoacă acumularea GMPc cu efectele respective (se utilizează în disfuncţia erecţiei). *Aptocina*, un modern inhibitor al FDE, majorează concentraţia GMPc, activînd proteinkinaza G şi provocînd apoptoza celulelor cancerigene.



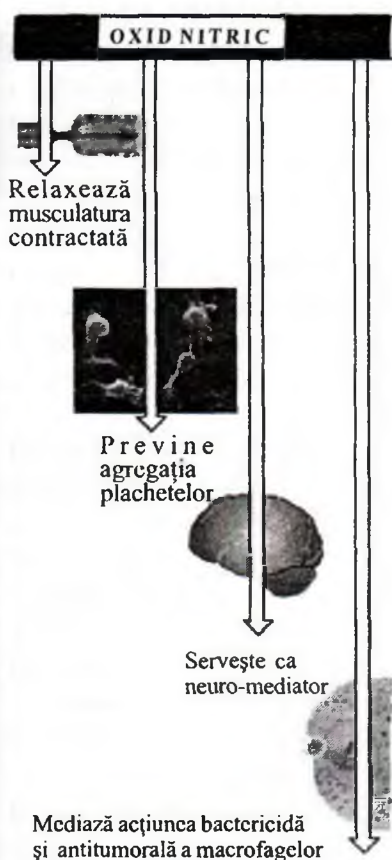
Un reglator deosebit este şi NO, acţionînd nu numai intracelular, dar şi extracelular. Ultimul efect e determinat de faptul că NO este un gaz lipofil ce uşor părăseşte membrana celulară. El se deosebeşte de reglatorii obişnuiţi atît prin incapacitatea de a se depozita în celulă, cît şi de a realiza un efect direcţional. NO acţionează asupra tuturor celulelor, reprezentînd un reglator de volum. NO cauzează ADP-ribozilarea GADPH (gliceraldehid-tri-fosfat dehidrogenaza), determinînd în consecinţa diminuarea glicolizei.Concentraţii majore de NO înhibă fiero-şi metaloproteinele, inclusiv enzimele ciclului Krebs şi lanţului respirator, provocînd apoptoza şi necroza celulelor macroorganismului şi a agenţilor invazivi (bacterii, fungii etc).

NO endogen e factor primordial în reglarea diferitelor procese biochimice şi fiziologice. Multe dintre ele sunt determinate de activarea formei solubile a GMPc. Ambele forme, solubilă şi fixată de membrană, reprezintă nu doar diferite proteine, dar şi enzime cu diverse mecanisme de reglare.

Guanilatciclaza solubilă este un heterodimer compus din 2 subunităţi imunologice diferite. O caracteristică esenţială a enzimei e prezenţa la suprafaţa ei a grupelor labile sulfhidrice, uşor oxidate de oxidanţi de diferită origine ce activează enzima. O acţiune mai îndelungată a oxidanţilor inhibă enzima. O altă particularitate a ei este prezenţa în structură a hemului.

Rolul hemului în funcţionarea guanilatciclazei constă în activarea coerentă a enzimei de NO şi *NO – sisteme generatoare.* Activatorul real al enzimei e complexul nitrozil-hem, ce se formează la interacţiunea grupei NO cu hemul enzimei. S-a stabilit că GMP-ciclaza, în lipsa hemului, pierde capacitatea de a fi activată de NO.

În ultimii ani s-au studiat mai minuţios domeniile funcţionale ale GMP-ciclazei solubile

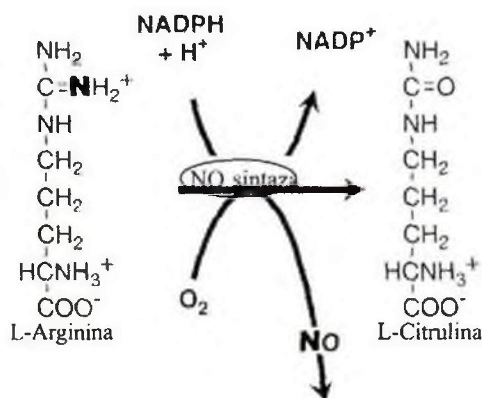


şi rolul resturilor cisteinil în funcţionarea enzimei. S-a constatat că centrele reglatoare şi catalitice sunt decuplate şi se află în diferite porţiuni ale subunităţilor. Centrul catalitic e situat la capătul C-terminal al α şi β subunităţilor. El e responsabil de formarea GMPc şi nu e sensibil la NO.

Capătul N-terminal al β-subunităţii răspunde de stimularea GMP-ciclazei de NO. Locul de fixare a hemului în enzimă nu e stabilit, însă mutaţia punctiformă a histidinei 105 în β-subunitate cu fenilalanina distruge legătura hemului cu proteina, astfel GMP-ciclaza pierde capacitatea de a fi activată de NO, dar se păstrează activitatea catalitică bazală. De altfel, şi mutaţia Cys-78 şi Cys-214, situate în β-subunitate în apropierea histidinei 105, produce o proteină recombinată, nesensibilă la NO. Mutaţiile punctiforme ale 15 resturi de cisteinil în α şi β subunităţi cu serină produc o enzimă recombinată, ce îşi păstrează capacitatea de sinteză a GMPc. Un rol adecvat al grupelor SH nu se înregistrează.

Sistemul NO - GMPc e localizat completament în citozol şi activează proteinele-receptori specifici ca proteinkinaza G. GMPc participă în protejarea vaselor arteriale în ateroscleroză, hipertonii, hipertrofia miocardiacă. Sistemul respectiv reglează expresia genelor la diferite nivele – transcripţional şi posttranscripţional.

Care ar fi mecanismul acţiunii anti-hipertensive a NO? Prin activarea GMP-ciclazei solubile, intermediate de mecanismul dependent de hem şi acumularea GMPc. Apoi, activarea proteinkinazei GMPc dependente şi a Ca^{2+}-ATPazei, ce participă la defosforilarea catenelor uşoare ale miozinei, contribuie la ieşirea Ca^{2+} din celulele muşchiului şi, în final, la vasodilatare. Efectul curativ al nitrovasodilatoarelor (nitroglicerina etc.) e determinat de biotransformările lor, cu eliberarea şi interacţiunea NO cu hemul guanilatciclazei, activarea enzimei şi acumularea GMPc. Sinteza simplistă şi rolul NO este redată în schemele respective.



SISTEMUL NEUROENDOCRIN

Homeostazia, după W.Cannon, este o axiomă în fiziologie, o constantă relativă, cu unele devieri esențiale. Asigurarea homeostaziei în organism necesită o interacțiune a multiplelor procese, cu prezența unor complexuri de mecanisme de control. Nucleul acestor mecanisme constituie sistemul neuroendocrin, unde funcționează bucle externe și interne de retroinhibiție. În reglare participă și diferiți metaboliți tisulari, ce determină o autoreglare fină a produsului de geneză hormonală.

Sistemul nervos nu-i permeabil pentru peptide, posedă o proprietate adversă pentru steroizi și hormoni tireoizi. Adeno- și neurohipofiza se află în afara barierei hematoencefalice, unde circulația sanguină e cea mai intensivă din întregul organism. Funcția adenohipofizei e reglată de sistemul nervos, factorii hipotalamici. Hormonii relizing ajung, în mod fiziologic, la hipofiză prin sistemul portal.

Se consideră că în sistemul nervos central (SNC) nu există regiuni anatomice și histologice limitate, care ar regla eliminarea unui anumit hormon hipofizotrop (relizing factor). Referitor la fiecare hormon în parte, există o codificare neurotransmițătoare în celulele neurosecretoare, ce fixează eliminarea produselor specifice. Deci, la eliminarea unui factor relizing conlucrează semnalele din diferitele celule ale unei regiuni anatomice relativ mari, dacă se efectuează cu ajutorul unui tip de neurotransmițător. Ținînd cont că SNC favorizează secreția factorilor în diferite condiții, e posibil ca reglarea secreției acestui factor în fiecare caz să fie stimulată de diferite neurosemnale, ceea ce înseamnă că celula neurosecretoare posedă receptori la diferite semnale, fiecare dintre ele fiind eliminat de fibre speciale activate de stimulente bine determinate.

Neurosemnalele pot provoca excitarea sau inhibiția celulei neurosecretoare. Reacția definitivă va reflecta efectele concentrației locale a neurosemnalelor modificate de concentrația diferitor ioni, pH, hormonii glandelor periferice și a hipofizei. În hipotalamus, mai precis în podiumul mediu, s-au stabilit toți neuroemițătorii existenți – catecolaminele, indolaminele, acetilcholina, histamina. S-au depistat și enzimele ce iau parte la sinteza și metabolismul lor.

Hormonii secretați de hipotalamus (tab.7.1), fiind peptide relativ mici, conțin 3-15 resturi de aminoacizi. S-a stabilit structura multor hormoni, dar pentru izolarea și identificarea lor s-a depus o muncă enormă. Pentru a căpăta 1 mg de tiroliberină, s-au utilizat 4 tone de hipotalamus extras din creierul animalelor. Studiile realizate de R.Gullemin și A.Schally, în 1977, sunt apreciate cu premiul Nobel.

Tiroliberina (TL), primul hormon identificat, constituie un tripeptid (piroglutamil-histidil-prolinamid). Aproximativ 80% revine TL extrahipotalamice. Perioada de înjumătățire este de 4 minute. Hormonul determină sinteza TSH și accelerează realizarea efectului prolactinei (PRL).Efectele sunt mediate de receptorii membranari cuplați cu $G_{G\alpha}$ – fosfolipaza C - β calcium - proteinkinaza C, ca mesageri secunzi. Efectul TL e blocat de hormonii tiroizi ce sintetizează o proteină inhibitoare și blochează acțiunea TL. Corticoizii au efecte similare, blocînd atit secreția TL, cît și a TSH, de asemenea ei nu micșorează reacția prolactinei la TL.

Somatoliberina (GHRH) – tetradecapeptid, produs de sistemul dopaminergic (TIDA) al hipotalamusului. Stimulează sinteza GH mediată de AMPciclic.

Tabelul 7.1. ***Structura relizing-hormonilor hipotalamusului***

Hormonul	*Structura*
Tiroliberina	(piro) Glu-His-Pro-NH_2
Somatostatina	Ala-Gly-Cys-Lys-Asn-Phe-Phe-Trp-Lys-Thr-Phe-Thr-Ser-Cys-NH_2 (punte S—S între Cys și Cys)
Gonadoliberina	(piro) Glu-His-Trp-Ser-Tyr-Gly-Leu-Arg-Pro-Gly-NH_2
Prolactostatina	(HO)₂-C₆H₃—$CH_2CH_2NH_2$; GnRH-pepdid ligand (GAP)
Corticoliberina ovinelor	Ser-Gln-Glu-Pro-Pro-Ile-Ser-Leu-Asp-Leu-Thp-Phe-His-Leu-Leu-Arg-Glu-Val-Leu-Glu-Met-Thr-Lys-Ala-Asp-Gln-Leu-Ala-Gln-Gln-Ala-His-Ser-Asn-Arg-Lys-Leu-Leu-Asp-Ile-Ala-NH_2
Somatoliberina	Tyr-Ala-Asp-Ala-Ile-Phe-Thr-Asn-Ser-Tyr-Arg-Lys-Val-Leu-Gly-Gln-Leu-Ser-Ala-Arg-Lys-Leu-Leu-Gln-Asp-Ile-Met-Ser-Arg-Gln-Gln-Gly-Glu-Ser-Asn-Gln-Glu-Arg-Gly-Ala-Arg-Ala-Arg-Leu-NH_2

Somatostatina e compusă din 14 aminoacizi. T1/2 e foarte mică, efectul e determinat de micșorarea producerii de AMPc. Poate fi produsă și extrahipotalamus în celulele pancreasului și tractului gastrointestinal. Inhibă sinteza GH și neutralizează efectul GHRH mediat de G_{Ia} inhibiția adenilatciclazei. Efectul inhibitor e blocat de ionii de Ca^{++}. Posedă un spectru biologic larg de acțiune.

Corticoliberina (CRH) conține 41 aminoacizi. Stimulează sinteza ACTH și a β - endorfinelor în adenohipofiză, accelerează modificările posttranslaționale ale POMC. efectul este blocat de cortizol, determinat de sinteza unei proteine inhibitoare.

S-a studiat și sistemul **gonadoliberinelor** care-i mediat de AMPc. Oscilațiile în activitatea acestor neuroni hipotalamici corelează cu modificările în secreția gonadotropinelor și reprezintă decapeptide (GnRH și LHRH).

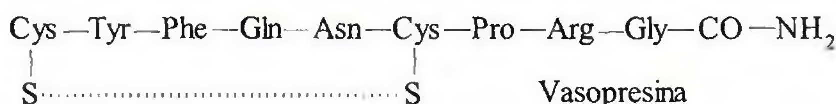
Prolactostatina este produsă în TIDA și se realizează în eminența mediană. Este inhibitorul prolactinei și al mamosomatotropilor în adenohipofiză. Efectul este mediat de D2 receptori cuplați cu G_{Ia} inhibiție a adenilatciclazei. Indirect, este inhibată și realizarea efectului LH și FSH.

Sunt atestați mai bine de 12 factori ce reglează secreția hormonilor adenohipofizari.

NEUROHIPOFIZA

Hormonii ei – *vasopresina* şi *oxitocina* – sunt sintetizaţi în corpul neuronilor, nucleelor supraopticulare şi paraventriculare, se acumulează în granule cu proteine transportatoare, denumite neurofizine, şi se deplasează prin axoni la terminaţiile lor, unde şi se conservează. Sinteza trece printr-un precursor, cu scindarea şi formarea nonapeptidelor.

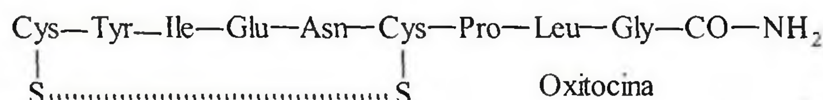
Vasopresina diferă de oxitocină prin posedarea fenilalaninei în loc de izoleucină, în inel, şi a argininei în loc de leucină, în catena laterală. Sinteza hormonului e asociată cu sinteza neurofizinei corespunzătoare. Secreţia hormonului şi a neurofizinei are loc prin exocitoza dependentă de Ca^{++}.



Reglarea secreţiei: factorul primordial este creşterea osmolarităţii plasmei (hemoconcentraţie), sesizată de osmoreceptorii hipotalamusului şi de baroreceptorii din sistemul circulator. Secreţia e strict dependentă şi de modificările volumului fluidului extracelular, de starea funcţională a sistemului şi receptivitatea lui. Ca stimulatori servesc diferiţi factori: voma, hipoglicemia, stresul nespecific (emoţiile, durerile, efortul fizic). Stimulează secreţia şi zaharoza, manitolul, iar ureea şi glucoza, practic, nu o modifică. Perioada de înjumătăţire (T1/2) e de cîteva minute. Degradarea are loc în ficat şi rinichi. Dintre ioni, Na determină 95% din presiunea sanguină.

Mecanismul de acţiune a vasopresinei, denumit şi *hormonul antidiuretic*, participă la homeostazia osmolarităţii şi a volumului fluidului extracelular prin reglarea eliminării renale de apă (măreşte permeabilitatea membranei luminale a epiteliului tubular din tubii contorţi distali şi colectori). Anume de hormoni depinde absorbţia aproximativ a 19 L de lichid în 24 ore. Vasopresina (VP) se leagă de receptori, activînd adenilatciclaza. Se consideră că VP modulează efectul prostaglandinelor, pe cînd inhibitorii sintezei lor (indometacina) potenţează efectul vasopresinei.

Oxitocina stimulează secreţia, contracţia celulelor mioepiteliale, ce înconjoară alveolele mamare, ejectarea laptelui. Oxitocina exercită şi o acţiune contractilă asupra musculaturii netede din uter. Joacă un anumit rol la iniţierea travaliului la femeia gestantă la termen, şi expulzarea fătului. Receptivitatea uterului pentru oxitocină este stimulată de estrogeni şi inhibată de progesteronă.



ADENOHIPOFIZA

Hormonii ei au o structură perfect stabilită şi o funcţie destul de clară. Sunt de natură polipeptidică şi se clasifică în 3 categorii, fiecare cu particularităţile sale :

1) familia corticotropinei (ACTH, MSH, lipotropina şi peptidele afiliate);

2) familia hormonilor glicoproteici (TSH, FSH, LH şi gonadotropina corionică - placentară);

3) familia hormonilor somatomamotropi (GH, prolactina - PRL - şi lactogenul placentar).

Corticotropina (ACTH)

Structura ei conţine un peptid unicatenar compus din 39 de aminoacizi (fig.7.13).

La toate animalele examinate, cei 24 aminoacizi de la capătul N terminal erau la fel. Capătul C terminal posedă anumite deosebiri de specie, dar nu esenţiale. Activitatea biologică e determinată de cei 24 aminoacizi la capătul N'. O parte a moleculei ACTH intră în componenţa peptidelor înrudite: în - α MSH atestăm secvenţa 1-13, în peptida asemănătoare cu corticotropina – secvenţa 18-39, în β-LP secvenţa 47-53, identică cu cea din ACTH 4-10. Fragment de această natură posedă şi alte peptide: β-LPH, β-MSH.

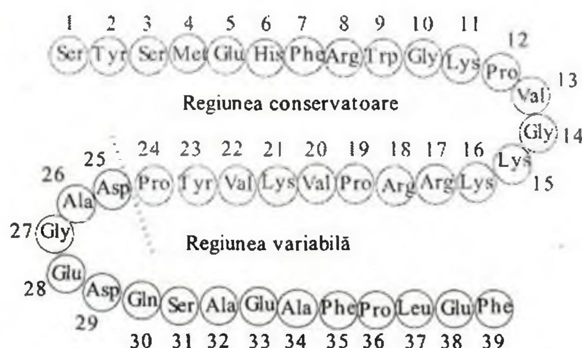


Figura 7.13. *Structura ACTH umane*

Biosinteza. Molecula reprezintă o parte a unui precursor cu o masă moleculară mare denumită proopiomelanocortină (POMC) (fig.7.14). La prelucrarea primară şi secundară rezultă mai multe peptide. Însă, deocamdată, nu este totul clar despre modul de formare a lor, multe semnificaţii rămîn ipotetice.

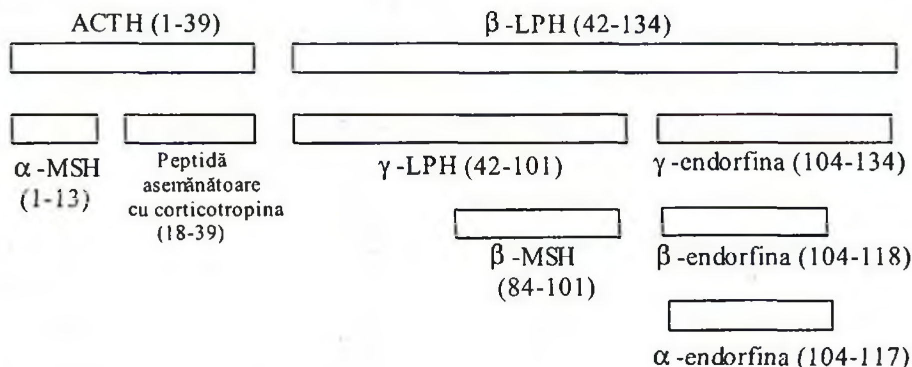


Figura 7.14. *Schema scindării moleculei de proopiomelanocortină*

Reglarea secreției decurge într-un ritm maxim intensiv dimineața și minim la miezul nopții. Sensibilitatea sistemului la stimulent e mai redusă dimineața. ACTH este secretat impulsiv, ce determină influența SNC. Diferiți stimulenți - stres fizic, emoțional etc., favorizează eliminarea liberinei corespunzătoare. În stres dispar oscilațiile diurne și nivelul cortizolului din sînge puțin e în stare să stabilizeze evoluția acestor reacții. Ciclul închis de reglare e determinat de efectul inhibitor al cortizolului.

Efectul biologic. Hormonul fixat de receptorii specifici ai membranei celulelor cortexului suprarenal stimulează:

a) steroidogeneza, adică transformarea colesterolului în pregnenolonă, prin intermediul AMPc, stimulînd secreția gluco-mineralocorticoizilor, androgenilor. Efectul e determinat de amplificarea activității fosforilazei și 11-β-hidroxilazei;

b) sinteza proteinei ce cauzează hipertrofia și hiperplazia celulelor suprarenale;

c) glicoliza și activitatea enzimelor ce formează NADPH, contribuind efectiv la hidroxilarea steroizilor.

Acțiunea este mediată de cortexul suprarenal: are loc amplificarea gluconeogenezei, diminuarea sintezei de proteine, mobilizarea lipidelor, stimularea reabsorbției apei și a sărurilor în rinichi. ACTH e un remediu efectiv la diferite stări clinice, cu acțiuni pozitive ale corticosteroizilor. Administrarea lor îndelungată duce la hiperfuncția suprarenalelor, concomitent cu secreția androgenilor (masculinizare), se soldează cu rezultate promițătoare.

ACTH, de altfel, stimulează eliminarea insulinei, GH; Perioada de înjumătășire este de 3-9 min, iar conținutul în sînge constituie 25 picogram/mL.

Ca răspuns la diferite semnale, o dată cu ACTH se produce secreția lipotropinelor în cantități echimolare, fiind sintetizate din același precursor.

În 1680, T.Sydenham scria: "Din toate medicamentele, pe care Cel de Sus le-a dăruit omului pentru a potoli suferințele, nu-i nimic mai efectiv și mai universal decît opiul". Care-i cauza că creierul omului posedă receptori la alcaloizii proprii semințelor de mac? Se presupune că acești receptori sunt capabili să sesizeze reglatorii interni ai senzației de durere. Morfina are un efect farmacologic datorită faptului că imite substanțe pe care le conține organismul. În 1973, J. Hughes a extras din creierul porcinelor 2 peptide cu o capacitate opioidică - pentapeptidele *metionil-encefalină* și *leucil-encefalină*, situate în cantități mari în terminațiunile nervoase.

În 1976, R.Guillemin extrage *endorfinele* cu un efect similar din lobul mediu al hipofizei, care produce o analgezie profundă, cu scăderea temperaturii corporale.

Secvența aminoacidică din endorfină e similară cu secvența de la capul C terminal la β-lipotropină. *In vivo* se formează la proteoliza ultimului, fiind un fragment al POMC. Acest prohormon conține 4 regiuni omoloage, generate în rezultatul dublării genei. Fragmentele din ulteriorii hormoni conțin perechi de aminoacizi bazici (Arg-Arg, Lys-Lys, Arg-Lys). Fragmente similare conțin și alți prohormoni. Aceste perechi de aminoacizi bazici sunt nu altceva decît acele semnale care indică locul favorabil proteolizei. Opiul exogen inhibă eliminarea opiului endogen, ce stă la baza fenomenului de *sindrom reabund.*

Hormonii glicoproteici

Hormonii glicoproteici posedă o structură dimeră compusă din α şi β subunităţi. La una şi aceeaşi specie, inclusiv la om, α-subunitatea e aproape la fel, pe cînd β - diferă, anume ea determinînd activitatea biologică. De asemenea se atestă o analogie şi în β unităţi (pînă la 50% aminoacizi).

Acelaşi proces conservativ se constată între specii – α-subunităţile TSH ale omului şi ale bovinelor sunt identice la 70%, β – 90%. Hormonii glicoproteici nu denotă particularităţi de specie. Capacitatea de legare cu receptorii celulari o posedă numai dimerul αβ.

Dintre componentele glucide se conţin fructoză, galactoză, galactoză-amin, manoză, şi numai acidul sialic este necesar pentru conservarea activităţii biologice, micşorarea vitezei de metabolizare. El nu participă la identificarea hormonilor de receptorii celulelor-ţintă.

Tireotropina (TSH). Glucidele se ataşează în urma sintezei lanţurilor peptidice. Hormonul conţine sulf (11 legături disulfidice), formînd punţi intercatenare. Efectul e determinat de AMPc; în final, amplifică transportul iodului, fixarea lui de proteină, majoreaza sinteza tireoglobulinei, accelerează proteoliza ei, cu eliberarea hormonilor tiroidieni. Tireotropina (TSH) stimulează sinteza RNA şi a proteinei, rezultînd hipertrofia glandei şi activarea circulaţiei sanguine. În glanda tiroidă se amplifică şuntul pentozo-fosfat de scindare a glucozei, glicoliza, activitatea ciclului Krebs, sinteza fosfogliceridelor şi a sfingolipidelor, prostaglandinelor şi utilizarea de O_2. NADPH format e necesar pentru asimilarea iodului, proces autonom de AMPc.

TSH stimulează lipoliza şi necesită ioni de calciu pentru aplicarea efectului menţionat. Perioada de înjumătăşire a hormonului este egală cu aproximativ 80 minute.

Reglarea: prin retroinhibiţie feedback tipic, determinată de hormonii tiroizi şi, de altfel, de semnale mediate de SNC, somatostatina şi liberina corespunzătoare. Temperatura joasă stimulează secreţia TSH. Hormonii tiroizi amplifică calorigeneza, fenomen caracteristic copiilor nou-născuţii. Cu vîrsta, necesitatea adaptării metabolice la frig scade, această funcţie o reia SNC. TSH inhibă secreţia glucocorticoizilor, somatostatinei. Estrogenii sensibilizează reacţia la hormonul tireotrop în perioada abundentă de estradiol, precum şi la administrarea estrogenilor. Fenomenul asemănător poate fi atribuit şi bărbaţilor.

Gonadotropinele. Hormonul foliculostimulator (FSH) stimulează dezvoltarea foliculilor ovarieni, prepară foliculul pentru ovulaţie şi mediază eliberarea de estrogeni induşi de LH (hormonul luteinizant).

La bărbaţi, hormonul acţionează asupra celulelor Sertoli, unde, împreună cu testosteronul, stimulează sinteza proteinei transportatoare de androgeni (ABP), secretată în lumenul canaliculelor. Proteinele concentrează hormonii în vecinătatea spermatocitelor, favorizînd geneza lor.

Hormonul luteinizant (LH) promovează maturizarea foliculilor, iniţiază ovulaţia, luteinizarea, sinteza de progesteronă şi estrogeni, amplifică transformările colesterolului în pregnenolonă. La bărbaţi, hormonul stimulează funcţia celulelor interstiţiale (Leidig) – producţia testosteronului, amplifică sinteza steroizilor în testicule şi ovare.

Perioada de înjumătățire (T1/2) la LH e aproximativ de 30 min, la FSH – o oră, la gonadotropina corionică – cîteva ore. Diferențierea e determinată de prezența acidului sialic, deoarece desializarea micșorează vădit perioada de înjumătățire. Efectul hormonal e determinat de participarea nucleotidelor ciclice. Pentru LH e vădită şi amplificarea sintezei unei prostaglandine din grupa E, ce intensifică activitatea în corpul galben al colesterol esterazei şi al colesterol-acil-transferazei – enzime implicate în sinteza acidului arahidonic, precursor al prostaglandinelor.

Reglarea secreției e un mecanism complex, multicomponent, unde:

a) secreția progresivă de estrogeni, efectuată de către folicul, se află sub acțiunea FSH şi LH, cu efect stimulant asupra hipotalamusului, amplificînd secreția gonadorelizing factorilor – efect pozitiv al retrolegăturii;

b) secreția estrogenilor e determinată de însuşi ciclul propriu al ovarelor;

c) progesterona reglează secreția, acționează prin mecanismul de retroinhibiție. Un efect asemănător îl au şi estrogenii după menopauză sau castrație chirurgicală.

La bărbați, atît testosteronul, cît şi estrogenii se reglează prin retroinhibiția gonadotropinelor. Testiculele sintetizează un polipeptid hormonal (***inhibina***), ce retroinhibă sinteza FSH. Efect inhibitor la nivelul hipotalamic şi hipofizar îl au prolactina şi glucocorticoizii (ultimul determinat de LH).

Grupa hormonilor somatomamotropi

Aceşti hormoni sunt compuşi dintr-un lanț polipeptidic cu legături disulfidice interne. Manifestă analogie structurală pronunțată în cadrul structurii primare (GH şi CS – somatomamotropina corionică – 83%, iar cu prolactină (PRL) – 16 si 13%, respectiv). Analogie se atestă şi la diferite specii – PRL la om şi la oaie = 73%; GH-64%. Aceşti indici confirmă că în procesul de evoluție nu s-au produs modificări semnificative în genom. Cu toate afinitățile, hormonii animalelor inferioare – primate, pe scară evolutivă n-au efect biologic la oameni.

Somatomamotropina (GH). Se sintetizează ca prohormon, apoi îşi pierde capătul N-terminal. Are efecte metabolice diferite. Unele dintre ele sunt determinate de interacțiunea lui GH cu receptorii membranelor diferitelor celule. În lipsa corelației dintre fixare şi efect, concluzionăm că unele efecte sunt mediate de anumiți factori de creştere, *somatomedinele*, multe dintre ele reprezentînd polipeptide cu diverse puncte izoelectrice ce diferă după secvența aminoacidică. Somatomedinele se fixează pe celulele-țintă, unde blochează eliberarea AMPc şi, în consecință, efectul va fi determinat de ionii de Ca^{++}.

GH facilitează procesele anabolice prin asigurarea cu materii prime şi surse energetice, accelerează sinteza proteinelor, facilitînd transportul intracelular al aminoacizilor, amplifică sinteza RNAm; reduce catabolismul proteinelor, favorizînd bilanțul azotat pozitiv.

Asupra metabolismului glucidic are efecte antagoniste cu ale insulinei, micşorînd asimilarea glucozei, inhibă glicoliza şi stimulează gluconeogeneza hepatică. Efectele descrise apar cu întîrziere ca şi cele ale metabolismului lipidic – accelerarea lipolizei, creşterea sensibilității la catecolamine (efecte diabetogene); influențează metabolismul mineral prin creşterea retenției ionilor de calciu, fosfat, magneziu.



Structura somatomamotropinei la om

Efectele acute determinate de GH sunt contrare în metabolismul glucidic şi lipidic.

Reglarea secreţiei:

1) secreţia GH este episodică şi pulsativă, controlată de factori hipotalamici eliberatori şi inhibitori;

2) e dependentă de concentraţia intracelulară a glucozei şi de viteza ei de modificare. Sporirea glucozei frînează secreţia, indiferent de metoda administrării;

3) administrarea *per os* a aminoacizilor stimulează eliminarea GH;

4) infuzia de emulsie lipidică cu heparină inhibă secreţia;

5) factorii stresanţi fizici, psihici, mai ales la copii, episodic stimulează secreţia. Predomină secreţia nocturnă egalată aproximativ cu 70%;

6) stimulează secreţia şi eliminarea estrogenilor, prolactinei, gonadotropinei, TSH, ACTH, MSH, vazopresinei, pe cînd astfel de hormoni ca glucocorticoizii endo- şi exogeni sunt inhibitori. *Gigantismul, acromegalia, splanhomegalia, piticismul hipofizar* sunt patologii determinate de excesul sau lipsa acestui hormon.

Prolactina (PRL). Prolactina umană conţine 199 resturi de aminoacizi uniţi între ei prin 3 legături disulfidice. Celulele-ţintă pentru acest hormon se află în glanda mamară. Acţiunea lui se manifestă după naştere, cînd scade nivelul estrogenilor şi al progesteronei. Hormonul stimulează sinteza lactalbuminei, grăsimilor, glucidelor din lapte. Pe suprafaţa celulelor alveolare se situează receptorii la PRL, care-şi sporesc numărul în raport cu cantitatea hormonului.

Estrogenii sunt sinergici la stimularea creşterii glandei mamare, dar se utilizează şi la inhibarea lactaţiei după naştere.

Reglarea secreţiei are un caracter de suprimare şi deteriorarea integrităţii sistemelor neuroendocrine de reglare amplifică secreţia PRL. Inhibitorul hipotalamic se află sub influenţa DOPA, efectul stimulator depinde de serotonină. Secreţia prolactinei e stimulată şi de stres, efort fizic, somn, coitus, excitarea mamelonului. Glucocorticoizii şi tiroxina o frînează.

GLANDELE PARATIROIDE

Aceste glande generează şi secretă **hormonul paratiroidian – PTH,** un polipeptid unicatenar compus din 84 resturi de aminoacizi. Segmentul 1-34 activ e asemănător cu cel al porcinelor şi bovinelor. Detaşarea de la N-capăt a serinei şi valinei conduce la pierderea activităţii biologice şi la păstrarea specificităţii imune. Capătul C-terminal joacă un anumit rol la fixare, micşorînd viteza de degradare în sistemul circulant.

PTH se sintetizează sub forma de pre-pro-PTH cu 115 aminoacizi. Detaşînd de la capătul N-7 şi de la capătul C-25 resturi de aminoacizi, el se stochează în granule sau degradează. Hormonul este sintetizat încontinuu şi într-un ritm constant, independent de fluctuaţiile calciului extracelular. Cantitatea lui din glande depinde de viteza degradării sale, dependentă de calcemie.

Degradarea are loc în ţesuturile periferice, în special în ficat. Diferite fragmente posedă şi diferite perioade de înjumătăţire, pînă la 40 de minute. În efectul hormonal e implicat AMPc – receptori specifici, situaţi în celulele-ţintă. La nivelul renal provoacă:

1) sporirea reabsorbţiei Ca^{++}, Mg^{++} aproape la 100% şi inhibă reabsorbţia ionilor K^+, P, HCO^-_3;

2) micşorarea excreţiei H^+, NH_4^+, cu o hipercalcemie şi o fosfaturie.

La nivelul oaselor, PTH suprimă sinteza colagenului în osteoblaşti şi amplifică osteoliza sub acţiunea osteoclaştilor şi osteocitelor. De altfel, PTH contribuie la maturizarea precursorilor, cu eliberarea ionilor de Ca^{++} şi fosfat în fluidul extracelular. Ca^{++} nu este fixat în oase şi poate avea loc resorbţia osoasă. În intestin, PTH stimulează absorbţia Ca^{++} printr-un mecanism indirect. Activează α-hidroxilaza renala, ce transformă vitamina D_3 (25-hidroxi) inactivă în metabolitul activ al vitaminei D_3 – 1,25-dihidroxicolecalciferol ce favorizează absorbţia Ca^{++} în intestin. PTH stimulează gluconeogeneza din aminoacizi, amplifică asimilarea oxigenului. La o hipersecreţie de PTH, matricea osoasă va suferi de insuficienţă de colagen, se va elibera mult Ca^{++}, în celule se vor acumula izocitratul şi lactatul.

Reglarea. Viteza de secreţie a PTH e invers proporţională cu concentraţia ionilor de Ca^{++}. La fixarea calciului de diferiţi factori, secreţia PTH va creşte. Ca^{++}, printr-un component membranar, stimulează formarea AMPc şi poate provoca direct o degradare lentă a prohormonului.

Hiperfuncţia cauzează hipercalcemia. În consecinţă, creşte cantitatea de calciu în urină, cu formarea calculilor, simultan se declanşează decalcinarea oaselor. În sînge se măreşte fosfataza alcalină.

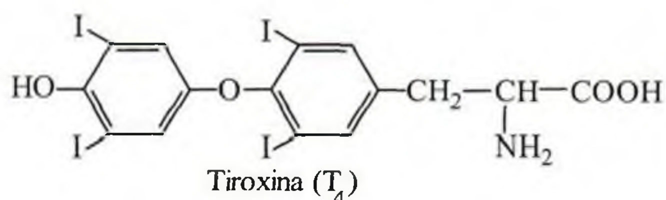
La insuficienţa renală cronică se acumulează fosforul, cu reducerea Ca^{2+} în ser, ceea ce stimulează formarea PTH. *Hipofuncţia* provoacă o hipocalcemie, cu convulsii tetanice. Corticosteroizii provoacă hipercalcemia.

Calcitonina este produsă de celulele C adiacente celulelor foliculare ale tiroidei. E un polipeptid compus din 32 resturi de aminoacizi necesari pentru efectul biologic. Conţinutul acestui hormon în sînge creşte o dată cu mărirea concentraţiei de Ca^{++} şi se micşorează la scăderea Ca^{++}. Gastrinele şi glucagonul stimulează secreţia calcitoninei.

Efectul e determinat de inhibiţia eliminării Ca^{2+} din oase la absorbţia lui intensivă în organism, preîntîmpină hipercalcemia şi micşorează eliminarea Ca^{++} şi a oxiprolinei prin urină. Tulburările de secreţie a calcitoninei provoacă dereglări ale metabolismului mineral, dar nu sunt la fel de periculoase ca în cazul dereglărilor echilibrului PTH.

HORMONII TIROIDIENI

Azi se cunosc mecanismele de biosinteză, acumulare şi secreţie a acestor hormoni – *tiroxina (T_4)* sau tetraiodotironina şi *triiodotironina (T_3)*, cărora le revine aproximativ 99% din cantitatea iodului organic secretat.



Tiroxina (T_4)

Distingem cîteva etape de sinteză şi secreţie (fig.7.17):

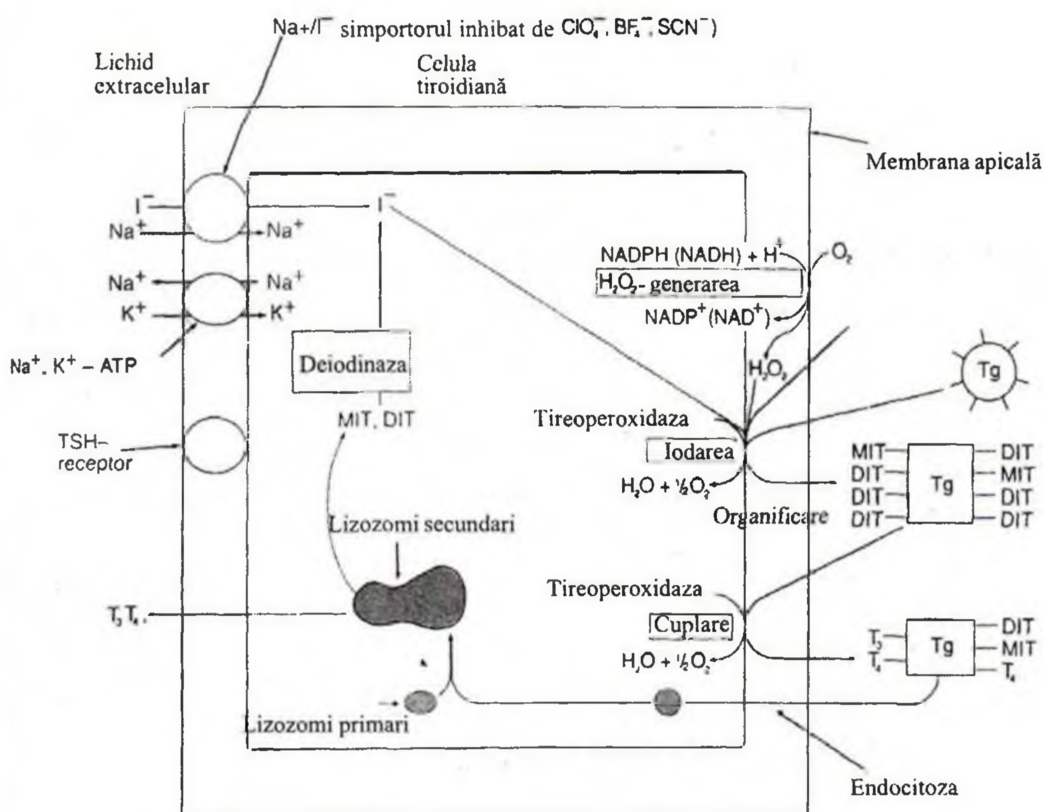


Figura 7.17. ***Sinteza hormonilor tiroidieni în tirocite. Tg - tireoglobulina***

1) B*iosinteza tireoglobulinei.* Ea reprezintă o glicoproteină cu o masă moleculară aproximativ de 670 kDa. E compusă din minimum 4 subunităţi (2 perechi asemănătoare ale diferitelor subunităţi), menţinute atît prin legături covalente (disulfidice), cît şi necovalente.

Subunitățile sunt codificate de diverse RNAm. Conțin 8-10% glucide și aproximativ 110 din cele 5900 resturi de aminoacizi sunt ale tirozinei. Catenele sintetizate sunt transferate în aparatul Golgi, împachetate, apoi stocate lîngă membrană și secretate în coloid. Complexul final – 19S – e o tiroglobulină matură.

Glicozilarea are loc la toate etapele de sinteză, înainte de a fi secretată, cu atașarea la resturile acidului aspartic prin legătura N-glucozidică. Acest proces e necesar pentru formarea conformației tridimensionale a structurii cuaternare a tiroglobulinei.

Sinteza durează 4-6 ore. Pe suprafața membranei, din partea coloidală, tireoglobulina este iodurată. Și dacă tirozina se conține în cantități suficiente (ca sursă servesc produsele alimentare și proteinele endogene scindate), apoi iodul este în cantitați limitate și sursa lui principală o constituie produsele alimentare.

2) *Captarea ionilor de iodură din plasmă.* O cantitate considerabilă a iodului pătrunde în organism în formă de ioni de iodură, prin absorbție în tractul gastrointestinal din apă, alimente (sare de bucătărie). O mică parte a iodului organic în ficat se transformă în iodură. Absorbția și concentrația iodurii în glanda tiroidă e asigurată de două mecanisme energodependente de captare, reglate de enzime. Unul din ele e situat pe membrana capilară și captează iodul din plasmă, îl transportă în citozolul celulei tiroidiene; altul se localizează în membrana apicală, transferîndu-l în spațiul coloidal. Simportorul Na^+/I^- prezintă o proteină integrală membranară, compusă din 13 segmente transmembranare. Funcția proteinei este reglată de TSH. Concentrația ionilor de Na^+ este echilibrată de funcționarea pompei Na^+, K^+-ATPazei. Aceste pompe funcționează foarte intens. La deficiența iodului, concentrația lui în glandă poate fi de 500 de ori mai mare decît în plasmă. Pentru a menține o secreție normală de hormoni, glanda trebuie să extragă toată iodura (30% din sîngele ce circulă prin ea timp de 24 de ore). Organismul e capabil să compenseze deficitul de iodură, amplificînd reabsorbția în rinichi și absorbția în intestine. Procesul de concentrare a iodurii e dependent de energia celulară și ionii de Ca^{++}. Captarea iodului în tiroidă este inhibată de *perclorat* (ClO_4^-), *tiocianat* (SCN^-), substanțe care se depun mai repede în glandă și provoacă o eliminare rapidă a iodului (competitori de inhibiție).

3) *Organificarea iodului.* Are loc pe membrana apicală a celulelor tiroidiene sau în preajmă, unde iodura este oxidată de *tireoperoxidaze* (TP), la care iodul se atașează la inelul fenol al resturilor de tirozină din tireoglobulină. Peroxidul de hidrogen este generat de NADPH/NADH sistemă oxidazică, care funcționează ca cea din leucocite. Tireoperoxidaza este o enzimă ce conține hem glicozilat fixat de membrana apicală a tirocitului. Are o masă moleculară de 110-105 kDa și un domen catalitic aranjat spre spațiul coloidal. Forma oxidată a iodului nu este eliberată din centrul activ al enzimei și este utilizată direct la iodurare. Sunt supuse iodurării numai unele resturi de tirozine din secvența aminoacidică a tireoglobulinei. *Propiltiouracilul, metimazolul, tiouracilul, tioureea* reprezintă inhibitori energici ai organificării iodului, cu efect asupra tireoidperoxidazei.

4) *Condensarea, cu formarea iodtironinelor*, se efectuează printr-un mecanism nedescifrat definitiv. Se produce cuplarea monoiodtirozinei (MIT) cu diiodtirozina (DIT), formînd T_3 și două molecule de DIT, cu generarea T_4. La deficitul de iod se

sintetizează mai mult T_3(mecanism de compensare). T_3 și T_4 rămîn ancorate în lanțul polipeptidic al tireoglobulinei. Ea este păstrată în coloid și reprezintă o rezervă mobilă, ușor manevrată de hormoni.

5) *Secreția* are loc prin endocitoza picăturilor de coloid în membrana apicală (internalizarea tireoglobulinei - TG), apoi urmează fuziunea picăturilor cu lizozomii și hidroliza TG. De rînd cu diverșii aminoacizi din fondul metabolic celular, sunt eliberați T_3, T_4, MIT, DIT. Hormonii T_3 și T_4 sunt eliminați în sînge, iar iodtirozinele sunt supuse unui proces de deiodurare, catalizat de *dehalogenaze (deioduraze) NADP* - dependentă. Iodul este recuperat ca iodură, transferat în spațiul comun iodurat și reutilizat pentru sinteza unei noi molecule de TG.

6) *Transportul hormonilor* e asigurat de trei proteine. Principalul rol în transferul specific (70%) îi revine unei glicoproteide compuse din 4 subunități cu aceeași masă – *globulină transportatoare de tiroxină* (inter α-globulină, după mobilitatea electroforetică se află între α_1 și α_2). Are un locus de fixare a hormonului. O altă proteină – *prealbumina* – fixează de patru ori mai mulți hormoni, dar la un pH egal cu 8,6. O cantitate mică poate transporta și proteina serică – albumina (20%).

Afinitatea T_3 cu proteinele e de 10 ori mai mică, ceea ce creează condiții favorabile pentru coaptarea lui de către țesuturi. Acest fapt are o influență asupra T 1/2, care durează pentru T_4 6-7 zile, iar pentru T_3 – 2 zile. E stabilit că 85-90% de iod plasmatic îi revine T_4 și numai 4-5% – T_3, iar aproximativ 5 % se află în iodură (iodul anorganic).

Reglarea secreției. Stimulator efectiv în sinteza tireoizilor e TSH, proces stimulat de catecolamine, prostaglandine, estrogeni. Glucocorticoizii, somatostatina, cît și concentrațiile de T_3 și T_4 au efecte inhibitoare asupra sintezei șe eliberării de TSH. TSH, după 5 min., activează adenilatciclaza, se amplifică iodurarea TG și formarea T_3 și T_4. Peste 5-10 min. se secretează pe contul rezervelor foliculare de hormoni tiroidieni.

La cîteva ore după administrarea TSH, se modifică unii parametri ai metabolismului celular, ai glucozei, fosfolipidelor, proteinelor, RNA. Peste 48 de ore crește sinteza DNA, mitoza celulelor. Majoritatea efectelor sunt determinate de AMPc.

În afară de funcția de control hipotalamo-hipofizar, glanda posedă *mecanisme de autoreglare.* La deficiența de iod, crește captarea iodului din plasmă. Glanda secretează mai mult T_3 decît în mod normal, mai activ biologic. Inițierea acestor modificări e determinată de scăderea nivelului plasmatic al hormonilor tiroidieni, ce stimulează secreția TSH. Simultan, se intensifică circulația sanguină în glandă, apare hipertrofia ei și crește forța de captare a iodului.

Concentrația iodului este reglata de un *mecanism intratiroidic*: surplusul de iodură inhibă sinteza și secreția hormonilor tiroidieni, care constă în diminuarea vitezei etapelor de organificare a iodului (*efectul Wolff-Chaikoff*); se micșorează captarea iodurii și se inhibă secreția hormonilor. Dozele masive de iodură saturează capacitatea mecanismelor situate pe membrana bazală (în stare normală, ea reține anionul în glandă). Ca urmare, iodura formată în glandă o părăsește, iar surplusul mărește secreția iodului eliberat la deiodurarea iodului aminoacidic. O atare inhibare e argumentată fiziologic. În caz contrar, produsul surplus va solda fenomene de hipertiroidism.

Metabolismul. Aminogrupele în ficat, sub acțiunea aminotransferazelor, sunt deportate, cu formarea cetoderivaților. Urmează o deiodurare, apoi o scindare a nucleului.

Hormonii, la fel ca şi derivații, pot fi conjugați cu formele active ale acidului glucuronic, sulfuric sau pot fi metilați de S-adenozil metionină (20%). Conjugatele formate sunt excretate prin bilă (20%) şi pot fi hidrolizate de bacteriile intestinale (decarboxilate); 80% din T_3 şi T_4 sunt supuşi 5 - deiodării, transformați în formele inactive. Rezultatul dezaminării şi decarboxilării este formarea unor compuşi ca 3,3', 5,5' - tetraiodtiroacetat şi 3,3', 5 - triiodtiroacetat – compuşi cu activitate biologică minoră. Iodida inorganică este eliminată prin urină (3/4 –488 µg/d), iar restul (–108 µg/d) este utilizată în sinteză hormonilor tiroidieni.

Efectele biologice ale tiroizilor sunt determinate de interacțiunea lor cu receptorii nucleici. Probabil, aceşti hormoni nu necesită o interacțiune cu receptorii citozolici pentru a fi translocați în nucleu. Locusurile din nucleu au o afinitate mare şi o capacitate mică la T_3 şi sunt asociate cu proteinele nehistonice nucleice ce există în toate celulele sensibile ale acestor hormoni. Procesul de fixare corelează cu activitatea biologică şi, o dată cu saturarea receptorilor, creşte activitatea polimerazelor, cu formarea RNA. Procesele stimulate din nucleu includ şi creşterea vitezei de sinteză a RNAm. Efectul stimulatoriu asupra activității diferitelor proteine (α-glicerofosfat dehidrogenazei, malic enzimei, carbamoil-fosfat sintetazei, arginazei, G-6-PDH, AGS) este mediat de amplificarea sintezei RNAm specifice.

Diferitele modulații ale efectelor acestor hormoni din țesuturile aflate în diverse stări fiziologice pot fi cauzate de modificările la nivelul postreceptoric, realizîndu-se prin schimbările vitezei de sinteză, a procesingului RNAm în nucleu şi, posterior, cu translare la diverse proteine specifice. Aceşti hormoni au o importanță deosebită pentru dezvoltarea fetală şi postnatală (formarea, evoluția şi funcțiile, practic, ale tuturor celulelor din organe şi țesuturi), în special, pentru sistemul nervos şi scheletic.

Hormonii tiroidieni posedă efect anabolic la nivel mitocondrial, se intensifică şi sinteza enzimei Na^+, K^+ - ATP-azei – consumatorul principal al ATP (pînă la 45% din toata energia). Funcționarea acestui mecanism reglează metabolismul oxidativ, oferind un efect calorigen, în ficat, rinichi, muşchii scheletali, muşchiul cardiac, țesutul adipos.

Disfuncții tiroidiene pot fi întîlnite la orice nivel al axei: hipotalamus-hipofiza-glanda tiroidă-țesut periferic.

Hipertiroidismul, mai răspîndit la femei, se întîlneşte sub formă de: hipertiroidismul Gravis, guşa multinodulară toxică şi adenoma toxică. Clinic se caracterizează prin: hiperkinezii, pierderea greutății corporale, anomalii cardiace (fibrilație arterială), oboseală, slăbiciune, transpirație, palpitații şi anxietate. Parametrii biochimici tipici sunt creşterea nivelului T_4 liber şi micşorarea TSH sanguin.

Hipotiroidismul, cauzat de patologia autoimună (tiroidita Hashimoto) sau ca consecință a terapiei utilizate în hipertiroidism, la adulți are un debut insidios cu o gamă largă de simptoame. În sînge sunt depistați T_4 liber la valori mici şi un nivel sporit de TSH. În diagnostic se utilizeată şi aprecierea anticorpilor antitireoglobulinici şi antitireoperoxidazici.

HORMONII CORTICOSUPRARENALIENI

Dereglările funcției endocrine a cortexului suprarenal la om are consecințe dramatice – *maladia Adison*. Interesul deosebit față de această afecțiune a favorizat studiile respective. Biosinteza hormonilor steroizi e o secvență completă de etape controlate de către enzime. Precursorul chimic asociat e colesterolul, care nu numai că e absorbit de celulele respective din sînge, dar este și sintetizat de ele. Doar în celula sistemului nervos concentrația lui e mai mare, dar aici colesterolul e esterificat. Acești esteri conțin o mare concentrație de acizi grași polienici. Suprarenalele posedă și cele mai însemnate cantități de acid ascorbic, spre deosebire de toate celelalte organe ale omului.

Colesterolul captat din lipoproteinele plasmatice sau prin sinteza *de novo* se acumulează în granulele lipidice citozolice. În mitocondrii colesterolul se transformă în *pregnenolonă* prin intermediul unei enzime ce conține citocromul P_{450}. Se hidroxilează și eliberează fragmentul C6 (aldehidă izocaproică). Este reacția ce limitează viteza biosintezei hormonilor steroizi. Anume această etapă e controlată de stimulatorii suprarenalelor: *ACTH, K^+, angiotenzina II*. În lipsa lor, suprarenalele generează foarte puțină pregnenolonă și steroizi. Pregnenolona este transformată în gluco-mineralocorticoizi și hormoni sexuali prin trei reacții fermentative diferite.

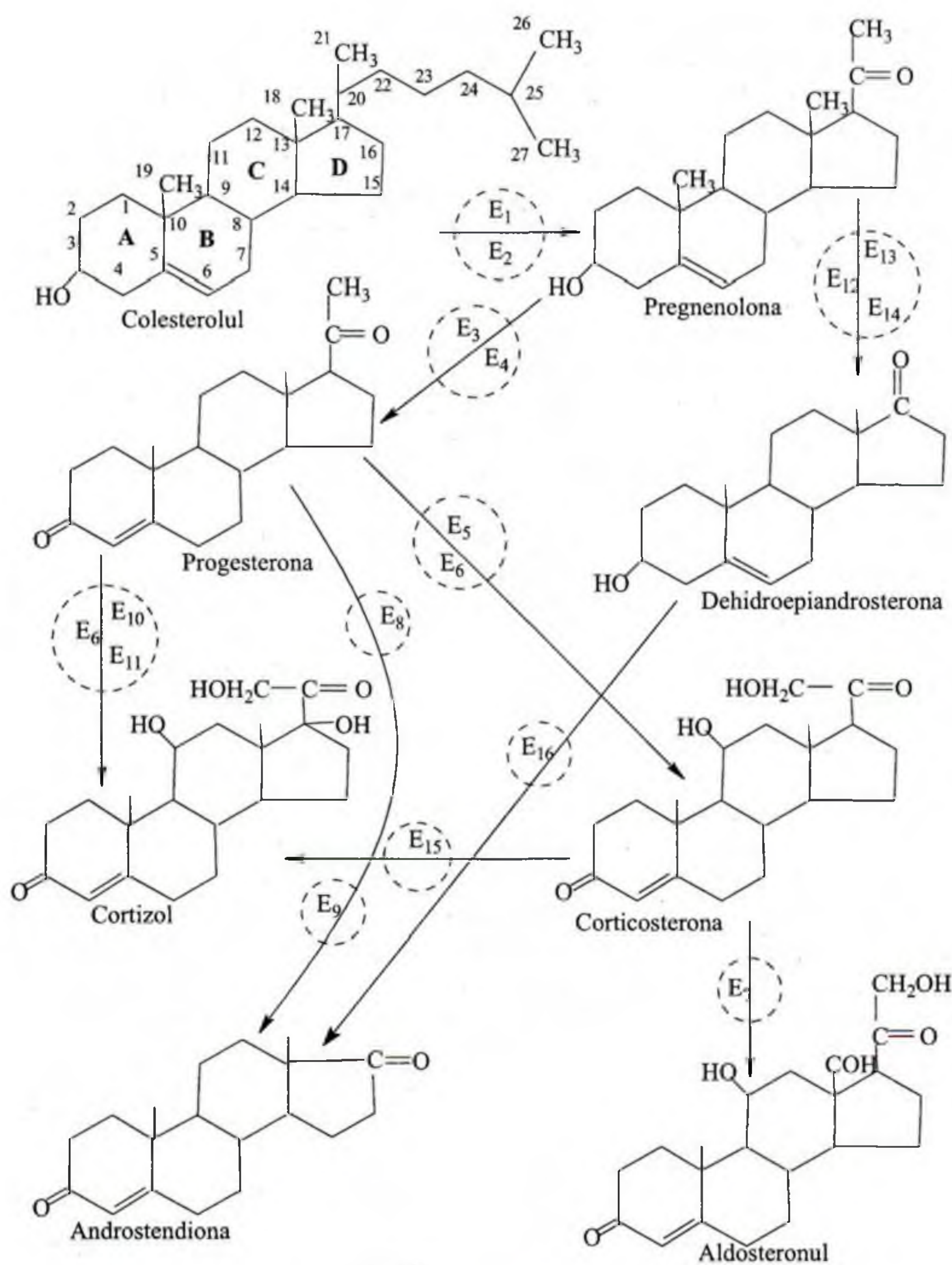
1. Calea principală e situată în zona reticulară (internă) și constă în dehidrogenarea și izomerizarea ei în progesteronă. O hidroxilază ce e prezentă numai în zona internă o hidroxilează la C_{17}, după care încă 2 hidroxilaze la C_{21} si C_{11} formează *cortizolul*. La șobolani, principalul glucocorticoid e *corticosterona*. La om se produce puțin. Calea de sinteză e aceeași, cu excepția etapei de hidroxilare în poziția 17.

2. În celulele zonei glomerulare (stratul exterior) din pregnenolonă, apoi corticosterona, prin hidroxilare și dehidrogenare, gruparea metil la C_{18} este transformată în gruparea aldehidică. Enzima se află numai în zona dată. Se consideră că sinteza *aldosteronului* e limitată anume de această zonă.

3. Sinteza de steroizi C_{19} în cortexul suprarenal este localizată la nivelul zonei interne (zona fasciculară plus zona reticulară) și în condiții fiziologice este redusă cantitativ, nu comportă semnificații. După o hidroxilare la C_{17}, are loc detașarea catenei laterale (de o liază) și se formează dehidroepiandrosterona (din pregnenolonă) sau *androstendiona* (din progesteronă).

În condiții fiziologice, transformările pregnenolonei în produse finale (cortizol, aldosteronul, corticosteronă, *dehidroepiandrosteronă*) au loc destul de rapid. Ele sunt unicele ce se acumulează în cantități suficiente pentru asigurarea unei secreții fiziologice necesare.

Hidroxilazele (I, II, III) reprezintă cîteva proteine și sunt atestate ca: FAD dependentă proteină; fieroproteină nehemică; hemoproteină - citocrom P_{450}. Enzimele necesită O_2 și NADPH – sursă de energie reductivă pentru hidroxilare. E posibil ca hidroxilazele să funcționeze drept complexe multienzimatice. În literatura de specialitate sunt descrise stări clinice înnăscute cauzate de deficitul unei sau mai multor enzime, participante la biosinteză. Ca rezultat, se depozitează și se secretă un surplus de antecesori ai reacției limitate. Blocurile fermentative la nivelul 21-,11-,17-hidroxilaze produc insuficiență de secreție a cortizolului – reglatorul cardinal al ACTH prin retroinhibiție. Nivelul ACTH



NOTĂ:

1. 20:Hidroxilaza
2. Desmolaza
3. 3-β-Dehidrogenaza
4. Izomaraza
5. 21:Hidrolaza
6. 11-β-Hidroxilaza
7. Aldosteron sintaza
8. 17-α-Hidroxilaza
9. 17,20:Liaza
10. 17-α-Hidroxilaza
11. 21-Hidroxilaza
12. 17-α-Hidroxilaza
13. 17,20:Liaza
14. 17,20:LIaza
15. 17-α-Hidroxilaza
16. 3-β-Dehidrogenaza

Structura şi sinteza steroizilor

în sînge va spori, şi suprarenalele vor deveni obiectul unei stimulaţii intensive, cu dezvoltarea hiperplaziei. Nivelul precursorilor blocului va creşte de cîteva ori pînă la un nivel patologic. Alte afecţiuni sunt redate în fig.7.15.

Insuficienţa 21-hidroxilazei conferă, la deficit de cortizol, aldosteron – o hipoglicemie cu pierderi de săruri (NaCl), şi, în consecinţă, apare surplusul de androgeni – virilizare. Tratamentul cu cortizol micşorează secreţia ACTH şi cantitatea de androgeni.

Metapirona inhibă 11-β-hidroxilaza şi, respectiv, creşterea adecvată a nivelului de 17-oxisteroizi derivaţi în urină şi a 11-dezoxicortizol în sînge, fapt argumentat convingător vizavi de menţinerea funcţiei suprarenalei şi a hipofizei.

Retenţia transformării colesterolului în biosinteză se datorează *aminoglutetimidei*. Acest preparat se utilizează la tratamentul carcinomei suprarenale.

Secreţia şi transportarea. Aproximativ 85-90% din conţinutul glucocorticoizilor este legat de proteine – *transcortină* (75%) şi *albumină serică* (15%). Aldosteronul se fixează aproximativ la 40%. Proteinele sunt sintetizate în ficat şi, la patologia lui, cantitatea lor se reduce, cu mărirea respectivă a fracţiei hormonului biologic activ. Tiroizii şi estrogenii amplifică sinteza transcortinei. Corticosteroizii nu sunt depozitaţi în celulă, ci secretaţi imediat după sinteză.

Fixarea cu proteinele plasmatice creează o rezervă de hormoni, un sistem de tampon ce supraveghează accesibilitatea hormonului pentru receptorii din celulele-ţintă, influenţează asupra clirensului sîngelui. Experimental, s-a stabilit că nivelul hormonului liber corelează cu efectul său biologic. Fiind fixaţi de albumină, corticosteroizii pot fi transferaţi în ţesutul nervos. Ţinînd cont de gradul de fixare (90% cortizol şi 40% aldosteronul), de permeabilitatea filtrului renal, aldosteronul poate satura receptorii săi, cu efectul respectiv asupra homeostaziei Na. Analogii sintetici nu se fixează de proteine, ci numai de receptori, care-s asimetrici, hidrofobi, puţin stabili.

Metabolismul reprezintă o varietate mare de reacţii, care inactivează hormonii şi-i transformă în compuşi hidrosolubili. Calea fundamentală constă în hidrogenare şi conjugare cu acid glucuronic la C_3. Steroizii C_{21} sunt eliminaţi prin urină ca 17-cetosteroizi (10%), iar cei C_{19} ca 11-dezoxi-17-cetosteroizi.

Reglarea secreţiei e completă şi include următoarele mecanisme:

1) Nivelul plasmatic al cortizolului, produs al stimulării prin corticoliberină şi ACTH, sistează rapid secreţia de CRH şi mai lent – de ACTH.

2) Nivelul plasmatic al cortizolului suferă o variaţie diurnă (ritm circadian), rezultat al alternanţei perioadelor de veghe-somn, maximum la trezire şi minimum spre seară.

3) Stările de stres, solicitările emoţionale, durerea, pe căi nervoase mediază eliberarea de CRH şi ACTH, cu sporirea nivelului de cortizol. Efectele metabolice ale cortizolului furnizează organismului mijloace de a suprima stresul, fiind o reacţie mai temperată decît a catecolaminelor, dar de o durată mai lungă şi cu ecouri mai profunde pentru metabolism.

Reglarea sintezei şi secreţiei aldosteronului e supusă unor mecanisme mai distincte faţă de cele care operează în cazul glucocorticoizilor.

1) *Sistemul renină-angiotenzină. Renina,* o enzimă proteolitică produsă de celulele aparatului juxtaglomerular, este eliminată în sînge sub influenţa presiunii acestuia, a concentraţiei clorurii de sodiu. Renina acţionează asupra *angiotenzinogenului* (proteină

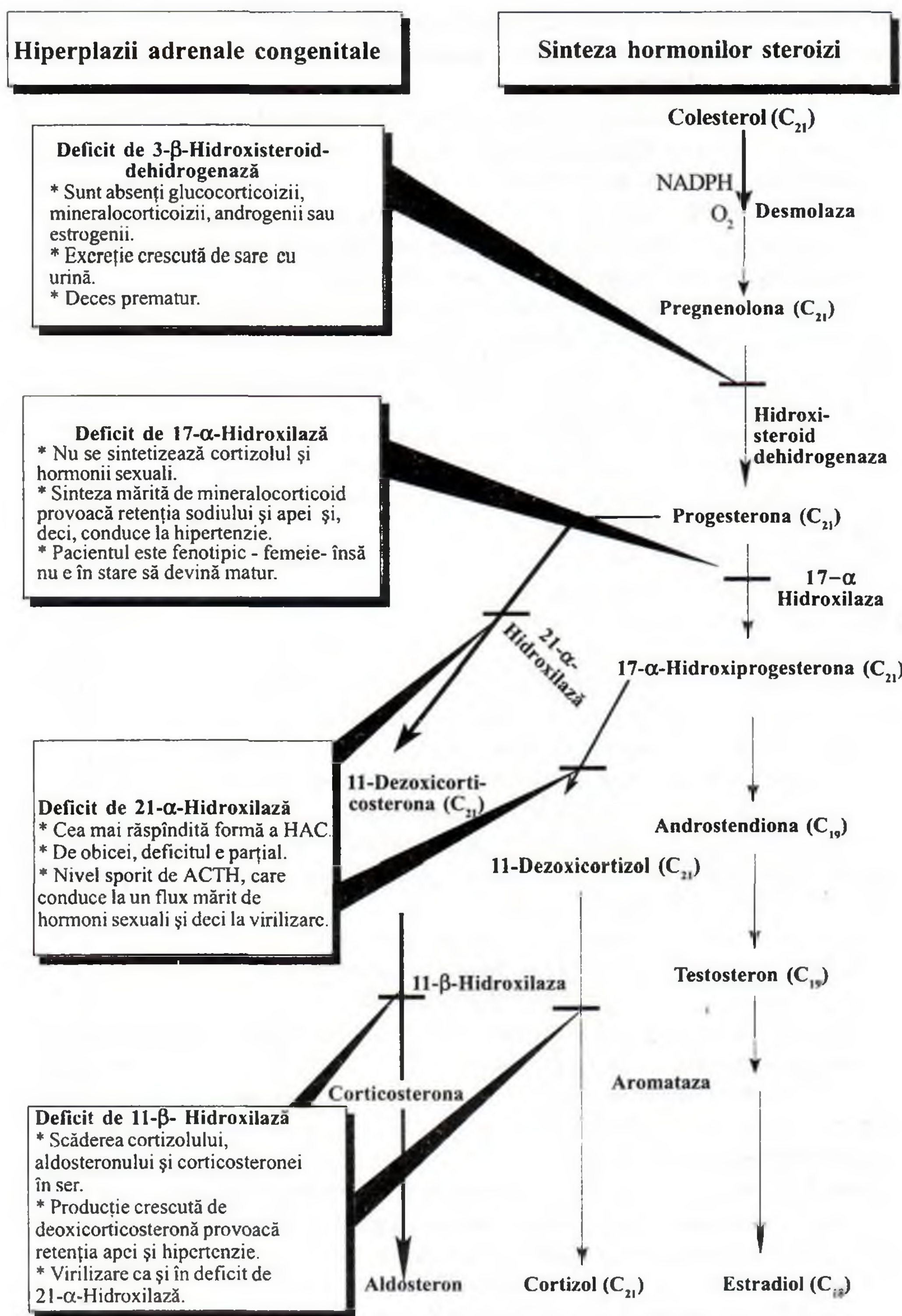


Figura 7.15. ***Sinteza hormonilor steroizi şi unele afecţiuni***

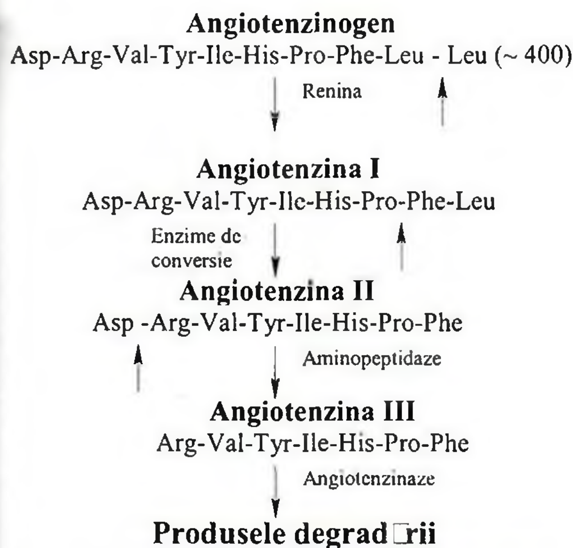


Figura 7.16 ***Formarea şi metabolismul angiotenzinelor***

plasmatică), detaşează un decapeptid, formînd *angiotenzina I*, care, sub acţiunea unei enzime de conversie, este transformată într-un octapeptid – *angiotenzina II* – substanţă vasoactivă energică, prin constricţia arteriolelor. Ea asigură şi eliberarea aldosteronului. Creşterea nivelului plasmatic al aldosteronului cauzează retenţie de sodiu şi, secundar, mărirea volumului şi a presiunii sîngelui. Perioada de înjumătăşire a angiotenzinei II este foarte redusă, fiind degradată sub acţiunea angiotenzinazei (fig.7.16).

2)Acest mecanism operează prin concentraţia ionilor de K^+. O uşoară creştere a kalemiei stimulează secreţia de aldosteron, care prin acţiunea kaliurică va restabili valoarea K^+. Scăderea kalemiei inhibă secreţia de aldosteron.

Efectul biologic.

Ţinînd seama că corticoizii au o structură asemănătoare, particularităţile lor biologice sunt determinate de mici modificări structurale şi nu-i de mirare că efectele acestor molecule interferează, înregistrîndu-se la concentraţii mari de hormoni.

Receptorii glucocorticoizilor se localizează în majoritatea ţesuturilor, în concordanţă cu influenţa reglatoare benefică a cortizolului şi a substanţelor înrudite. În lipsa hormonilor, receptorii devin instabili şi demonstrează o afinitate mărită şi stereospecificitate vădită la analogii sintetici – *dexametazol.*

Receptorii aldosteronului se situează în ţesuturile rinichilor, vezicii urinare, intestinelor, glandei parotide. Comparînd afinitatea acestor 2 clase de receptori la steroizii corespunzători, s-a constatat că aldosteronul, în concentraţii mici, fiziologice, primordial se fixează de receptorii săi, dar în concentraţii mari – de receptorii glucocorticoizilor.

Glucocorticoizii în cantităţi fiziologice nu posedă însuşiri mineralocorticoide, dar în concentraţii enorme se leagă şi cu receptorii aldosteronului, provocînd retenţia sărurilor. Complexul hormon-receptor activ se fixează de un DNA-segment, conţine o porţiune de moleculă receptorie, cu resturi de Lys, Arg, His, şi se modifică sub influenţa agenţilor ce acţionează asupra grupelor sulfhidrilice.

Rezultă efectul direct asupra activităţii RNA-polimerazei. Are loc amplificarea transcripţiei genelor specifice, ce codifică enzimele respective: *triptofan-2,3-dioxigenaza, tirozin aminotransferaza* etc.

Cortizolul exercită multiple acţiuni asupra metabolismului intermediar: anabolice, catabolice, în raport cu natura ţesutului, starea organismului, în funcţie de concentraţia altor hormoni.

Metabolismul glucidic:

1) amplifică gluconeogeneza din aminoacizi în ficat, cu depozitarea glucozei în glicogen, activînd enzimele responsabile respective. Aminoacizii utilizați sunt rezultanți ai degradării proteinelor musculare şi ai inhibării coaptării lor pentru sinteza proteinelor extrahepatice;

2) reține transferul glucozei din sînge în țesuturi (adipos, muşchi), ce cauzează hiperglicemie, glucozurie şi hiperinsulinemie. La o perioadă îndelungată de administrare, se soldează cu degenerarea şi istovirea celulelor Langerhans şi, implicit, la diabet zaharat;

3) evident că adrenalectomia măreşte sensibilitatea la insulină şi, deci, decade problema utilizării insulinei. Gravitatea diabetului zaharat se atenuează.

La hipofuncția cortexului suprarenal, inaniția neîndelungată poate fi fatală pentru organismul uman, fapt cauzat de lipsa corticoizilor, conținutul mic de glicogen în muşchi, reducînd capacitatea de lucru a individului.

Metabolismul proteinelor şi al acizilor nucleici :

Glucocorticoizii în ficat stimulează sinteza proteinelor specifice şi, simultan, sunt inhibitori puternici ai sintezei lor în muşchi şi limfocite, ceea ce provoacă o degradare esențială a lor pînă la atrofia musculară şi osteoporoză. În plasmă apar cantități enorme de aminoacizi şi degradarea lor măreşte cantitatea de uree, cauzează apariția unui bilanț azotat negativ.

Metabolismul lipidelor :

Glucocorticoizii în organele centrale (față, trunchi, ficat) favorizează depunerea de grăsimi, pe cînd la nivelul țesutului adipos, mai ales la extremități, exercită o acțiune lipolitică.

Cortizolul exercită şi acțiuni permisive (de intensificare a efectelor unor hormoni) asupra adrenalinei, glucagonului, hormonului de creştere. În concentrații mari, acționează imunosupresiv, ceea ce e condiționat de inhibarea transportului diferitor metaboliți: glucoză, aminoacizi, K^+, micşorarea sintezei de ATP, proteine, acizi nucleici şi, de asemenea, ca efect primar – stopează activitatea RNA polimerazei DNA dependente. Are capacitatea de a suprima procesul inflamator – reține migrarea leucocitelor şi eliminarea de substanțe ce determină reacția inflamatorie.

Patologii medicale. Consecințele unor maladii infecțioase sau reacții autoimune este atrofia cortexului adrenal – insufucienţa adrenocorticală primară – *maladia Addison*. În afecțiune discreşte nivelul de cortizol şi aldosteron cu reținerea de potasiu şi pierderea de sodiu, ce duce la o hiperkalemie, *hipovolemie* şi *hipotensiune*. Lipsa cortizolului măreşte sensibilitatea țesuturilor la insulină, provocînd o hipoglicemie. De asemenea se diminuiază receptivitatea țesuturilor la catecolamine, mai ales în vasele musculaturii, care nu vor răspunde la o stimulare α-adrenergică, provocînd uşor un colaps circulant.

Deficiența steroid sulfatazei (*STS*) – o eroare metabolică ereditară x-dependentă determină apariția *ictiozei* (patologia pielii) la bărbați, iar la femei are loc diminuarea sintezei estrogenilor în perioadele cele mai tîrzii ale gravidității, avînd în consecință un travaliu prelungit. Deficiența enzimei cauzează creşterea nivelului de colesterol sulfat în sînge şi piele. Colesterol sulfatul în keratocite dereglează sinteza colesterolului ce ar fi cauza afectării pielii.

Hipercortizolismul primar (*sindromul Cushing*), ca regulă este cauzat de o tumoare adrenocorticală autonomă şi se evaluează prin nivel plasmatic scăzut de ACTH. Pentru acest sindrom sunt caracteristice toate efectele descrise pentru excesul de glucocorticoizi cu dezvoltarea intoleranței la glucoză. *Adrenalectomia* corijază aceste modificări, dar impune necesitatea tratamentului cu glucocorticoizi. În cazul tumorii unilaterale celălaltă glandă se atrofiază din cauza suprimării secreției de ACTH. Supraproducerea de cortizol de cortexul suprarenal hipertrofiat poate avea loc din cauza hipersecreției de ACTH (*hipercortizolism secundar*). Afecțiunea poate fi determinată de defect la nivelul hipofizar-hipotalamus sau de produceri ectopice de ACTH. Primul caz este cunoscut ca maladia Cushing, iar celălalt ca sindromul ACTH-ectopic. În ambele cazuri cortexul suprarenal funcționează normal şi secretă cortizol în dependență de nivelulu plasmatic de ACTH. În diagnosticul diferencial un rol deosebit îl are răspunsul la administrarea timp de 3 zile a dexametazonului: în boala Cushing are loc supresia secreției de ACTH, ce nu se observă în transformările maligne în sindromul ACTH-ectopic.

Aldosteronul menține homeostazia hidrică şi electrolitică, determinînd retenția ionilor de Na^+ şi, în mod secundar, promovează eliminarea renală de H^+, K^+ şi NH_4^+. Retenția de sodiu antrenează şi retenția osmotică de apă. O dată cu sodiul, sunt reținuți Cl^- şi HCO_3^- nu numai în tubii renali distali, colectori, dar şi în celulele epiteliale la nivelul glandelor salivare, sudoripare şi al intestinului.

Transportul se produce prin permeabilitatea pasivă a membranei apicale, apoi ionii de Na^+ sunt expulzați din celulă printr-un mecanism activ, consumator de ATP (pompa de sodiu acționată ca Na^+/K^+ - ATP-aza).

Hiperconcentrația la o *hiperfuncție* majorează volumul lichidului extracelular al ionilor de Na^+ şi HCO^-_3. Concomitent, creşte presiunea sanguină, suferă schimbări caracteristice ECG, se micşorează excitabilitatea sistemului nervos, diminuează sinteza proteică în oase, cu pierderea Ca^{++}, osteoporoza, Ca^{++} se elimină cu urina. Sîngele atestă un nivel scăzut de K^+.

Ca regulă hiperaldosteronismul primar (sindromul Conn) este determinat de adenoma cortexului suprarenal cu producerea aldosteronului, care nu se supune reglării prin K^+ *sau sistemului renin-angiotenzină. Hipernatriemia* şi *hipervolemia* reprimă sinteza reninei. În procesele cronice volumul sîngelui mărit favorizează filtrarea glomerulară, cauzînd pierderea urinară de Na^+ şi apă nondependente de aldosteron. Acest fenomen «evadare», nereglat hormonal, pledează în favoarea absenței hipertensiunii severe în acest sindrom. În hiperaldosteronismul secundar se constată nivel înalt al reninei plasmatice, cu creşterea conținutului de *angiotenzină II* şi a aldosteronului. În consecință – nivelul mare de Na^+, *hipervolemie*, vasoconstricție, hipertensiune. În caz de *hipoabuminemie*, hipervolemiea nu măreşte presiunea arterială dar cauzează şuntarea lichidului în spațiele interstițiale cu apariția edemului normotensiv.

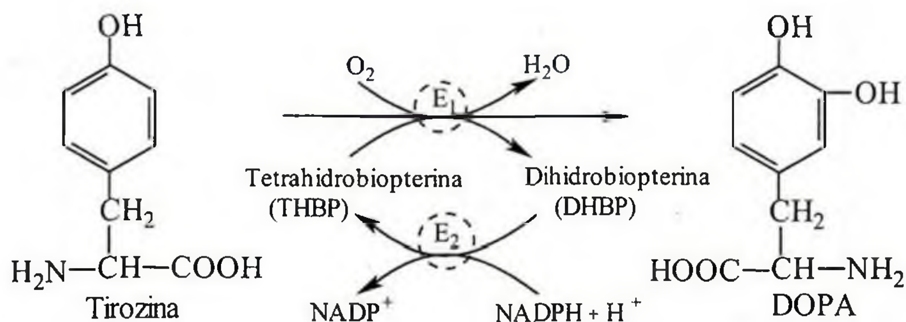
Hipofuncția provoacă pierderi de Na^+, Cl^- şi apă, cu majorarea K^+ în ser şi în țesuturi. Bicarbonații sunt transportați în celule şi H^+ – în lichidul extracelular, provocînd acidoza; nu e excretat H^+ şi nici NH^+_4, hiperhemoconcentrație; creşte excitabilitatea țesutului nervos; apare pericolul bradicardiei pînă la stop cardiac. Pierderea lichidului din rinichi cauzează insuficiența renală. Apa consumată excesiv poate provoca

intoxicații. O dietă cu un conținut mare de Na^+ și mic de K^+ ar preveni multe fenomene nedorite la insuficiența cortexului suprarenal, ar compensa disbalanța minerală și ar preîntîmpina consecința letală.

HORMONII MEDULOSUPRARENALIENI

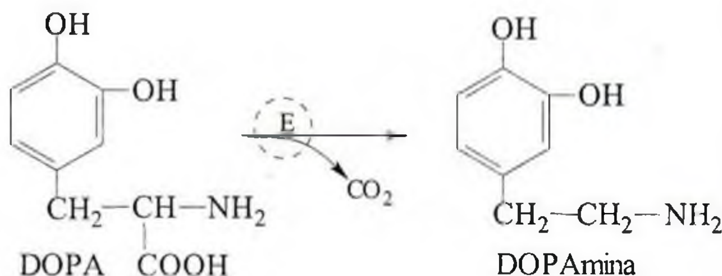
Produse de porțiunea de origine nervoasă – *catecolaminele* – sunt o parte a sistemului nervos simpatic. *Adrenalina* se mai secretă în terminațiile nervoase ale hipotalamusului. *Noradrenalina* se eliberează în neuronii simpatici ai sistemului nervos central și periferic, este neuromediator și acționează local în celulele efectorii ale mușchilor netezi, vaselor creierului, inimii, ficatului. *DOPAmina* este neurotransmițător la nivelul unor terminații nervoase în anumite regiuni ale creierului; în sînge e absentă și servește ca precursor biosintetic pentru adrenalină și noradrenalină.

Biosinteza. Substratul primar e tirozina liberă ce rezultă din hidroliza proteinelor endo- sau exogene, prin hidroxilarea fenilalaninei. Ultima este o reacție - limită catalizată de o monooxigenază – *tirozin hidroxilaza* (E_1).



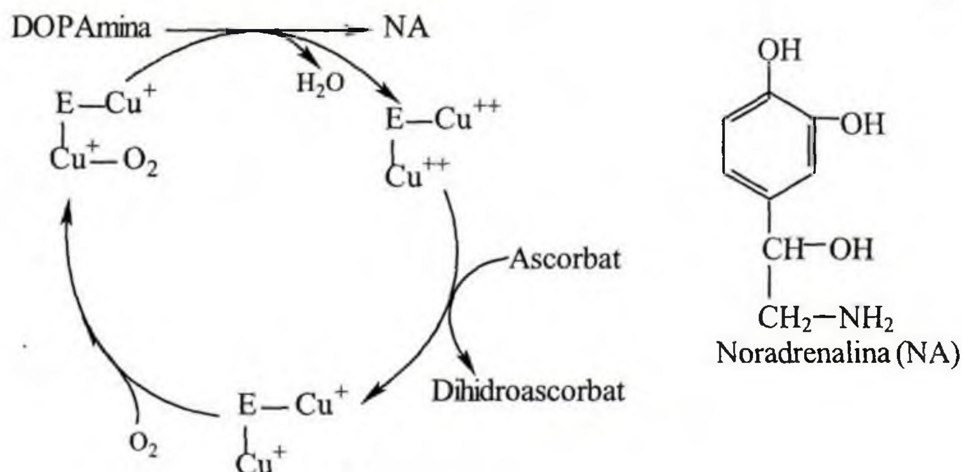
Enzima e reglată de: 1) conținutul de substrat (tirozină) în celulele cromafine; 2) de cofactorul pteridinic redus (Fe^{++}); 3) prin retroinhibiție o reglează și noradrenalina; 4) activitatea enzimei poate fi reținută și de Phe, inhibitor necompetitiv, ce joacă un anumit rol în condiții de acumulare excesivă în celule, ca în fenilcetonurie.

Următoarea etapă constă în decarboxilarea DOPA în dopamină de *DOPA decarboxilază*, mai bine zis, o decarboxilază a L-aminoacizilor aromatici, avînd drept cofactor piridoxalfosfatul.



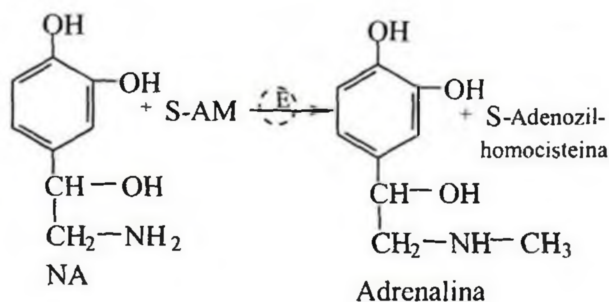
Enzima are o afinitate mare la substrat şi, ca urmare, viteza reacţiei nu este influenţată de inhibitorii viguroşi ai enzimei. Ambele reacţii au loc în matricea celulară, sub acţiunea enzimelor citozolice.

Apoi, DOPAmina este activ transferată de un mecanism dependent de ATP în granulele cromafine, ce conţin enzima *DOPAmin-β-hidroxilază*, transformînd substratul în *noradrenalină* (NA).



Enzima e o oxidază. NA se elimină în citozol, unde conferă efect rezervat *tirozin hidroxilazei.*

Etapa finală constă în metilarea NA de către S-adenozil metionină, reacţie catalizată de o enzimă citozolică *feniletanolamin-N-metil transferază.*



Enzima conlucrează numai în compartimentul medular. Dacă toate celulele posedă capacitatea de a sintetiza NA, apoi cea de metilare o deţin numai celulele specifice. Adrenalina este transferată în altă grupă de granule, unde se conservează pînă la eliberare.

Depozitarea. Catecolaminele sunt depozitate în granule, în complexul, ce include catecolaminele,.o proteină denumită cromogranina A, ioni de Mg^{++}, Ca^{++} şi o cantitate mare de ATP. În concentraţii majore ATP favorizează efectiv depozitarea catecolaminelor (neutralizînd aminele bazice).

Eliberarea (secreţia) se efectuează prin exocitoză totală atît a conţinutului granulei, cît şi al membranei. De aceea, în celulă are loc o sinteză *de novo* a enzimei (*DOPAmin-β-hidroxilaza*) şi a componentelor membranare. Inhibitorii sintezei proteice stagnează sinteza şi secreţia noradrenalinei. În condiţii neordinare, *acetaldehida* care se acumulează în urma metabolizării alcoolului stimulează secreţia catecolaminelor, fără exocitoză.

Reglarea. Drept semnal pentru eliberarea catecolaminelor serveşte *acetilcholina* din fibrele preganglionare. Interacţiunea ei cu receptorii celulelor cromafine conduc la o depolarizare locală, cu fluxul de Ca^{++}, promotor al expulzării conţinutului granular. S-a constatat o legătură dintre aceste procese şi starea proceselor oxidative şi glicolitice. Substanţele ce inhibă funcţia microfilamentelor (*colhicina, vinblastina*) inhibă şi eliberarea catecolaminelor.

ACTH şi glucocorticoizii amplifică activitatea enzimelor ce participă la sinteza catecolaminelor. Glucocorticoizii modulează nivelul feniletanolamin-N-metil transferazei şi, în final, cantitatea adrenalinei produsă de substanţa medulară.

Nivelul tirozin hidroxilazei şi DOPAmin-β-hidroxilazei, în mare parte, e dependent de conţinutul din sînge al ACTH. Stresul, majorînd secreţia ACTH şi a glucocorticoizilor, sporeşte şi producţia de catecolamine. Doar sîngele venos din porţiunea corticală trece prin cea medulară şi creează posibilităţi de concentraţii mari de glucocorticoizi, înainte de a fi diluaţi în circuitul sanguin. Anume aceste intercorelaţii motivează reacţiile comune ale acestor glande endocrine la stres.

Savanţii au determinat şi o specificitate anume la eliberarea catecolaminelor: hipoglicemia sau nicotina favorizează eliberarea adrenalinei; obturarea arterei carotide eliberează preponderent noradrenalina.

Catecolaminele posedă diverse efecte biologice: noradrenalina provoacă constricţia vaselor, adrenalina – dilatarea lor în muşchii scheletali, cu un pronunţat caracter metabolic. Adrenalina creează o situaţie pasivă de tensionare, pe cînd noradrenalina generează agresie şi alte reacţii periculoase.

Metabolismul si inactivarea catecolaminelor. Catecolaminele se metabolizează şi se inactivează în una din trei structuri anatomice:

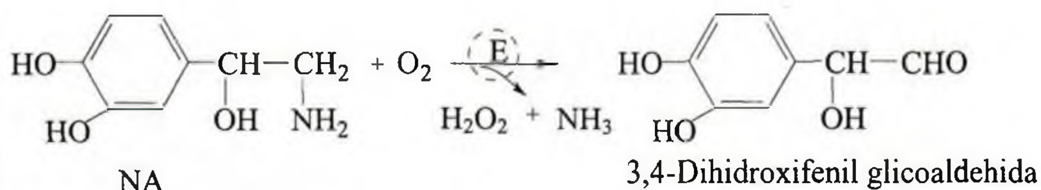
1) În interiorul neuronului ce secretă catecolamine, după încorporarea ulterioarăi în citozol, în procesul numit *retrocaptare*. În neuronii creierului funcţionează perfect un mecanism de inactivare a lor, ca neurotransmiţători. Amina înglobată pătrunde în granule şi-i reutilizată de neuron într-un nou ciclu.

2) În celulele efectoare, după efectul biologic, sunt reutilizate.

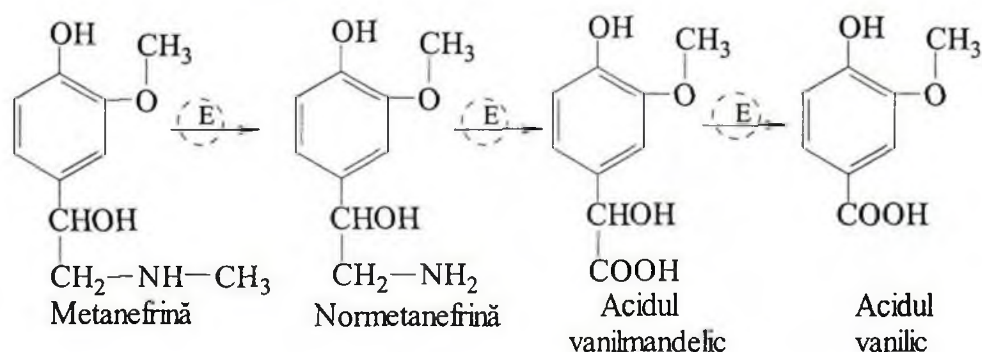
3) În ficat şi rinichi, sunt metabolizaţi, unde T1/2 e pînă la 30 de secunde.

Metabolizarea decurge cu participarea *MAO-monoaminooxidazei* şi a *catecol-O-metil transferazei* – ambele enzime reprezentînd o combinaţie de izoenzime. Acţiunea combinată a acestor enzime rezultă, în final, catabolitul denumit *acid vanilmandelic*, ce se elimină prin urină. Există şi cataboliţi intermediari (*metanefrină* şi *normetanefrină*).

MAO-flavoproteidul, ce solicită pentru funcționarea sa Cu^{++}, este enzima constituentă a membranei interne a mitocondriilor.



Efectul biologic. Catecolaminele acționează asupra unui număr mare de țesuturi, care cuprind receptori adrenergici (α–α1 și α2; β–β1 și β2), fiind cuplați cu diferite sisteme mesageriale secundare, deci și răspunsul țesuturilor la catecolamine va fi diferit. Receptorii β1 și β2 sunt cuplați cu adenilatciclaza, prin intermediul Gs-proteinei, și va favoriza majorarea concentrației AMPc. Receptorii α2 sunt cuplați cu o altă G proteină, care va favoriza scăderea AMPc, pe cînd α1 determină creșterea de Ca^{++} intracelular, prin intermediul inozitoltrifosfatului.



Catecolaminele, prin efectul lor asupra sistemului circulator, metabolismului, reglării secreției unor hormoni, au un rol important la adaptarea organismului către diverse afecțiuni. Medulosuprarenala nu are importanță cardinală pentru viață, însă absența secreției medulare absolvă organismul de capacitatea de protejare, devenind vulnerabil la diverși factori stresanți, cu impact încontinuu. Lipsa medulosuprarenălelor ar putea fi tolerată atîta timp cît SN autonom rămîne fucțional intact.

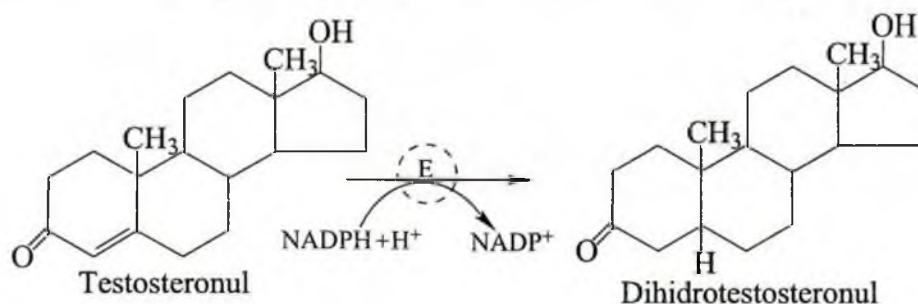
Excesul de catecolamine întîlnit la pacienții cu tumori ale celulelor cromafine (*feocromocitome*) se caracterizează prin hipertensiune arterială intermitentă sau permanentă cu potențiale consecințe amenițătoare pentru viață. Diagnosticul constă în aprecierea nivelului plasmatic de adrenalină, noradrenalină sau și a metaboliților – metanefrina, normetanefrina, acidul vanilmandelic în urina diurnă. O sensibilitate majoră o are determinarea conținutului plasmatic al metanefrinei. Feocromocitomele sunt înlăturate chirurgical.

HORMONII SEXUALI

Hormonii testiculari sunt androgenii, **ovarieni** – estrogenii şi progestinele. Androgenii sunt sintetizaţi în celulele interstiţiale din testicul – testosteronul şi dihidrotestosteronul, în cantităţi mai mici.

Biosinteza. Primele etape de sinteză sunt aceleaşi ca şi la toţi steroizii; transformările colesterolului sunt catalizate de complexul enzimatic mitocondrial *colesterol-desmolază*, ce solicită NADPH, Mg^{++}, Ca^{++}, citocrom P_{450}, la care se formează *pregnenolona*. Enzimele ce se includ ulterior sunt localizate în reticulul endoplasmatic şi formează *progesterona* – calea majoră de sinteză. Modificările de mai departe constau în scindarea catenei de la C_{21}, cu formarea compuşilor C_{19}.

Din *testosteron*, în testicule sau în ţesuturile periferice se formează *dihidrotestosteronul*, prin acţiunea unei *5α-reductaze* NADPH dependente.



Hormonul (T) este eliminat în sînge pe masură ce se formează. Forme de depozitare nu se atestă. Transportul este efectuat de o proteină plasmatică cu o afinitate mai mare la testosteronul ce leagă atît T, cît şi estrogenii.

Hormonul este catabolizat primordial în ficat prin oxidare, reducere de dehidrogenaze NAD^+ şi $NADP^+$ dependente, cu crearea derivaţilor mai puţin activi, care apoi sunt conjugaţi cu acidul glucuronic sau sulfuric. Derivaţii finali reprezintă 17-cetosteroizi neutri, excretaţi prin urină – 1/3 sunt de origine gonadiană şi 2/3 – suprarenală.

Efectul biologic: controlează procesele fundamentale necesare dezvoltării şi funcţionării organelor sexuale, apariţia şi menţinerea particularităţilor sexuale secundare, spermatogeneza; rol anabolizant în dezvoltarea scheletului şi a muşchilor.

Androgenii comportă un efect substanţial în metabolismul azotului şi Ca^{++}, amplifică dezvoltarea ţesuturilor la animalele tinere. Efectele sunt determinate de:

1) amplificarea sintezei DNA în ţesuturile-ţintă;

2) translocarea RNA în citozol şi stimularea sintezei proteinelor specifice citoplasmatice;

3) intensificarea activităţii DNApolimerazelor şi a timidin-kinazelor;

4) stimularea sintezei proteinelor, cu afinitate majoră la DNA;

5) reglarea funcţiilor creierului şi a reacţiilor de comportament.

Rolul fundamental al acestor hormoni s-a demonstrat în baza experimentărilor de castrare în perioada prepubertară. La administrarea simultană a androgenilor, reacţia de răspuns a estrogenilor se tempereazā.

Dirijarea secreției are loc prin retroinhibiție, la care participă gonadotropinele (LH, FSH), gonadoliberinele şi testosteronul circulant.

Hormonii ovarieni (estrogenii), de rînd cu sinteza ovariană, se mai formează, în cantități mici, în adrenale, testicul şi alte țesuturi (ficat, piele). În timpul gestației, unitatea feto-placentară sintetizează cantități mari de *progesteronă.*

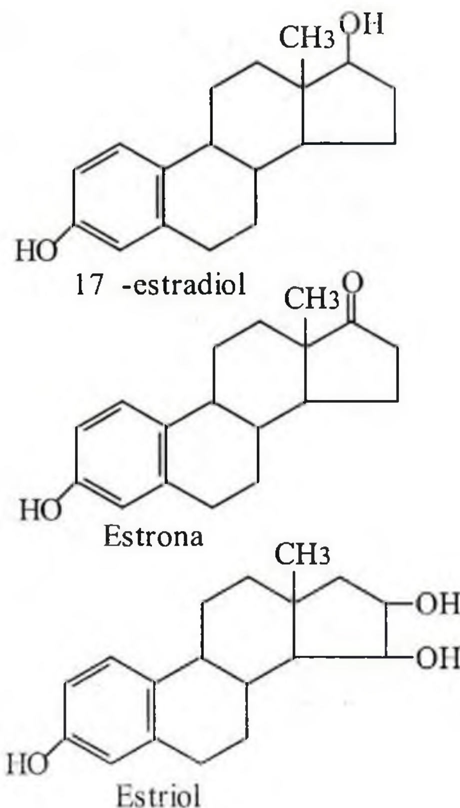
Estrogenii sunt steroizi C_{18}, dintre care principalul e *17β-estradiolul* de origine ovariană. *Estrona* şi *estriolul* se creează la metabolizarea estradiolului.

Biosinteza. Precursor este testosteronul. Transformarea are loc sub acțiunea unei *aromataze* – sistem enzimatic ce include 3 etape de hidroxilare fermentativă, cu participarea a 3 molecule O_2 şi 3 molecule NADPH. Ultima hidroxilare la C_2 e reacția - limită, cu aromatizarea nucleului A.

Secreția. După sinteză, hormonii se elimină în sînge, nu se depozitează. Sunt transportați de către o proteină (globulină). Progesterona se leagă de aceeaşi proteină, care fixează cortizolul. Afinitatea e aproape egală pentru ambii hormoni.

Catabolismul are loc în ficat. Catabolitul principal e estriolul eliminat după conjugare cu acidul glucuronic şi sulfuric, prin bilă şi fecale. Procesul e dependent de starea funcțională a glandei tiroide. La o hiperactivitate tiroidică, se reduce formarea estriolului. Controlul de secreție s-a redat la gonadotropine.

Efectul biologic. Acționează în țesuturile-țintă (uter, glanda mamară, adenohipofiză, hipotalamus, vagin), unde sunt situați receptorii specifici, cu o afinitate mare la estradiol. Complexul hormon-receptor este translocat în nucleu, interacționează cu proteinele nehistonice ale cromatinei, stimulînd sinteza de noi molecule ale mRNA, ce codifică proteine specifice, amplifică activitatea RNA polimerazelor.



Estrogenii accelerează renovarea fosfogliceridelor şi majorează nivelul Ca^{++} şi al P în ser, fapt ce implică diferite modificări în oase – de la creştere intensivă – la porozitate.

Administrînd estrogeni bărbaților, scade nivelul circulant al lipidelor în sînge, mai ales la bolnavii cu hiperlipidemii. Aceşti hormoni controlează dezvoltarea aparatului reproducător feminin, apariția şi menținerea caracteristicilor sexuale secundare, reglează ciclul ovarian, fecundarea, gestația, naşterea şi lactația. Estradiolul are rol anabolizant asupra oaselor şi cartilajelor, precum şi efect vasodilatator puternic.

Hormonii progestageni (luteali).

Corpul galben şi placenta în ultima perioadă a sarcinii secretă *progesterona*. Precursor în sinteză este *pregnenolona* – se sintetizează şi în corticosuprarenală şi testicule. În plasmă circulă legată de proteinele respective. În efectul lor necesită acțiunea anterioară sau concomitentă a estrogenilor. Aceşti hormoni reduc:

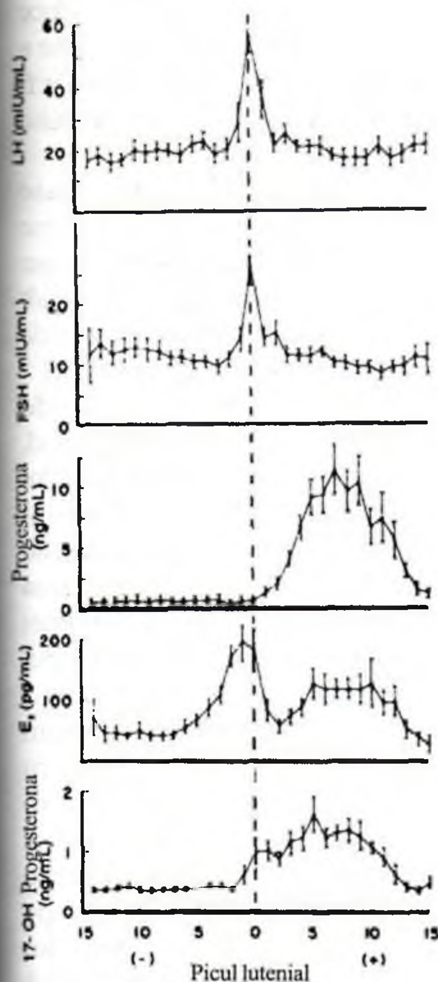
- acțiunea estrogenilor în proliferarea epiteliului vaginal şi uterin;
- motilitatea uterului;
- fluxul sanguin periferic;
- disiparea căldurii.

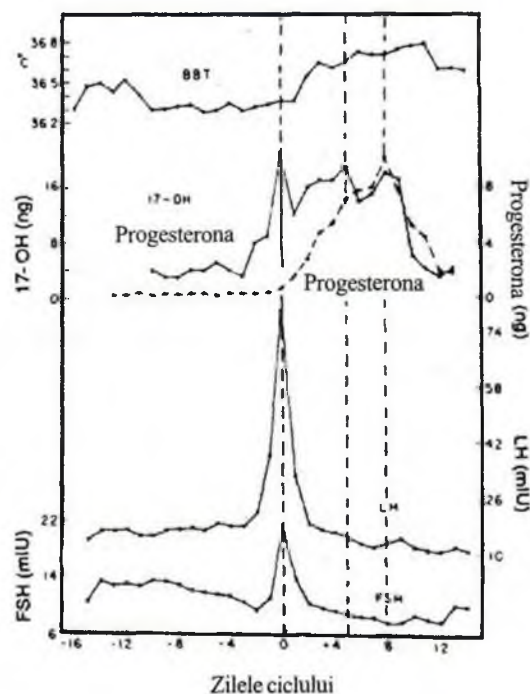
De asemenea, progestagenii măresc funcția secretorie a epiteliului uterin (favorizează implantarea ovulului fecundat) şi stimulează dezvoltarea glandelor mamare (facilitează lactația).

Controlul endocrin al foliculogenezei

Foliculul ovarian conține 2 tipuri de celule endocrine. Primul tip sunt celulele granuloase care se găsesc în folicul şi sunt înpachetate lîngă membrana bazală. Asemenea celulelor Sertoli din testicul, celulele granuloase sunt perfuzate de transudatul plasmatic, nu de sînge, şi posedă activitate aromatazică FSH-sensibilă; în acest mod FSH stimulează formarea estrogenilor. Spre deosebire de *celulele Sertoli* ele proliferează ca răspuns la estrogeni, pe cînd androgenii inhibă această proliferare. Funcția neendocrină constă în promovarea creşterei oocitelor prin producerea lichidului folicular. Celelalte celule foliculare cu funcție endocrină sunt celulele tecii interne, care se află nemijlocit lîngă peretele exterior al membranei bazale; în aşa mod , ele sunt localizate în afară folicului şi sunt perfuzate de sînge. Aceste celule, asemănător celulelor Leydig ale testiculului, răspund la stimularea cu LH printr-o producere de androgeni. Spre deosebire de celulele Leydig, ele produc prioritar androstendiona şi o cantitatea mică de testosteron. Celulele tecii interne aprovizionează celulele granuloase cu androgeni pentru sinteza estrogenelor.

Controlului hormonal al dezvoltării folicului. Pe parcursul fazei foliculare, foliculul ovarian (foliculul preantral) creşte pe baza proliferării pronunțate a celulelor granuloase. În perioada a II a fazei în folicul se acumulează lichid ce determină formarea foliculului antral. În foliculul preantral LH stimulează celulele interne cu producerea de androstendionă, care difuzează prin membrana bazală în interiorul compartmentului celulelor granuloase. FSH provoacă aromatizatea androgenilor (*estradiol*), care acționează direct asupra celulelor granuloase generînd proliferarea. Această determină creşterea foliculului şi acumularea de lichid conducînd la formarea unui atrum. Cu toate că, concentrația intrafoliculară a estradiolului este suficientă pentru stimularea proliferării, el nu trece în circulația sanguină – eliberarea LH şi FSH nu este inchibată şi ramîne la un nivel constant, adecvat în etapă antrală a dezvoltării foliculului. Producerea de estradiol de către celulele granuloase creşte din cauza apariției receptorilor specifici pentru LH. Inducția LH-receptorilor este determinată de efectul combinat al FSH-lui şi estradiolului, care permite celulelor granuloase se inițieze producerea de estradiol din pregnenolonă. În aşa mod este argumentată formarea estradiolului prin aromatizarea androgenilor ce provin din teaca internă. Pulul crescut al estradiolului determină o accelerare marcată a





Modificările hormonale şi fiziologice în ciclul menstrual (BBT - temperatura bazală)

creşterii foliculului şi o revarsare hormonală în circulaţie sanguină. Consecvent, o astfel de creşterea este observată pe parcursul ultimelor 5-6 zile a fazei foliculare, ce exercită un nou feed-back negativ asupra eliberării FSH-ului, semnal ce indică pregătirea folicului pentru ovulaţie. Acest mesaj în forma unii creşteri triple a nivelului estradiolului stimulează peste 2-3 zile eliberarea unii cantităţi majore de LH şi FSH – efect feed-back pozitiv. Estradiolul sensibilizează hipofiza la GnRH şi intensifică eliberarea GnRH în hipotalamus. Se crede că ultimul mecanism, implică formarea catecolestrogenului (2-hidroxiestradiol) după asimilarea de către eminenţa mediană, din care cauză cantităţi mari, concurează cu noradrenalina hipotalamusului pentru inactivarea de către COMT (catecol-orto-

metil-transferaza). Această inactivare determină un conţinut înalt al noradrenalinei în eminenţa mediană ceea ce favorizează eliberarea GnRH. Nivelul înalt de LH eliberat (valul preovulator al LH) ca răspuns la feed-back-ul pozitiv provocat de estradiol induce ovulaţia în aproximativ 1 zi, probabil prin producerea de către celulele granuloase a activatorului plasminogenului. Aceasta conduce la formarea plasminei, enzimă ce ar fi responsabilă de digestia, scindarea, dispariţia membranei bazale şi de ruperea foliculului (ovulaţia).

Controlulu hormonal al funcţiei luteale. După ovulaţie celulele granuloase proliferează ca răspuns la valul preovular al LH. Celulele tecii interne şi vasele sanguine perifoliculare învadează cavitatea foliculului colapsat. Sub influenţa LH celulele granuloase şi ale tecii interne se diferenciază în celulele luteale, caracterizate printr-un conţinut înalt de lipide. Aceste celule luteale sînt sferoidogene şi produc o cantitate înaltă de progesteronă şi moderată de estradiol. În aşa mod, foliculul rupt de vine corp galben.

Morfogeneza corpului galben nu este complet studiată. Producerea luteală de progesteronă şi estradiol treptat cerşte la maximum la 6-7 zi după ovulaţie. În aşa mod, există un interval de aproximativ 3 zile după ovulaţie, pe parcursul căruia nivelul estradiolului circulant este redus şi acest interval este necesar pentru transportul corespunzator al ovulului prin trompele lui Fallope în interiorul uterului. Expunerea la un nivel înalt de estrogeni pe parcursul acestui interval ar putea conduce la expulzarea sau la blocarea transportului ovulului. Creşterea nivelului de progesteronă şi estradiol pe parcursul primei săptămîni a fazei luteale este necesară pentru ca endometriul să devină secretor cu scopul de a pregăti implantaţia şi graviditatea.

Corpul galben are o durată de viaţa de aproximativ 12 zile, şi poate sintetiza autonom hormoni fără stimulare extraovariană. Cu toate că corpul galben are receptori pentru LH, eliberarea de LH (şi FSH) pe parcursul fazei luteale este inchibată puternic de feed-back-ul negativ, provocat de progesteronă şi estradiol. În aşa mod, dacă împlantarea şi fecundarea nu au loc, corpul galben degenerează (luteoliza) şi producerea de către el a progesteronei şi estradiolului scade. Refractarea progesteronei şi estradiolului pe parcursul luteolizei are ca urmare deteriorarea endometriului şi descvamarea lui (menstruaţia). Dacă fecundarea şi împlantarea au loc, secreţia de gonadotropină corionică (hCG) de către blastocitul implantat stimulează corpul galben să continuie producerea progesteronei. Astfel luteoliza este prevenită.

Regularitatea ciclului menstrual la femei de vîrstă reproductivă poate fi afectată de defectele anatomice ale uterului şi vaginului sau de cele structurale şi funcţionale ale axului hipotalamus-hipofiză-ovare, ce afectează secreţia hormonilor. Incetarea completă a menstruaţiei (peste 6 luni) se numeşte *amenoree*, iar reducerea frecvenţei - *oligomenoree*. Stările fiziologice de amenoree înclud prepubertarea, graviditatea, lactaţia şi postmenopauza. O cauza patologică răspîndită a amenoreei poate fi determinartă de reducerea secreţiei de GnRH de către neuronii hipotalamici în sistemul portal hipotalamo-hipofizar, urmată de micşorarea secreţia FSH şi LH de către hipofiză. Scaderea nivelului de GnRH poate avea loc din cauza pierderii în greutate, anorexii nervoase, exerciţii fizice excesive, maladii istovitoare, traume psihologice.

VITAMINELE

Generalităţi. Progresul biochimiei ca ştiinţă de prim rang a favorizat formarea conceptului ştiinţific contemporan despre raţia alimentară a omului, ceea ce a şi salvat nenumărate vieţi omeneşti. Pînă nu de mult astfel de boli ca pelagra, beri-beri, rahitismul erau foarte răspîndite în multe ţări, pe cînd azi aproape că au dispărut. Sunt studiate suficient cauzele apariţiei lor. 1/8 din populaţia Terrei nu se alimentează satisfăcător, din care cauză în fiecare minut mor de subnutriţie aproape 30 de copii. Paradoxal, dar mulţi oameni din ţările civilizate suferă de pe urmele unei alimentări incorecte, determinate nu de lipsa de alimente, dar de surplusul lor, de o nutriţie neechilibrată.

Una din sarcinile actuale ale biochimiei moderne este informarea ştiinţifică a oamenilor despre problemele alimentării raţionale, fapt ce ar proteja omenirea de diferite maladii, de escrocherii şi controversări în domeniul respectiv.

E stabilit că o raţie alimentară completă trebuie să includă următoarele substanţe nutritive, cu funcţii distinctive: surse de energie, aminoacizi esenţiali, acizi graşi esenţiali, elemente neorganice şi vitamine. Apa, deşi nu e substanţă nutritivă, totuşi e absolut necesară omului pentru supravieţuire.

Interdependenţa dintre caracterul raţiei alimentare şi unele stări morbide a fost observată demult. Hipocrate menţiona acţiunea pozitivă a ficatului la boala "orbul găinii". În evul mediu, navigatorii erau afectaţi îndeosebi de scorbut, boală care a cosit mai multe vieţi omeneşti decît naufragiile maritime sau luptele. Din timpul expediţiei lui Vasco-de-Gamma (1469-1524), din 168 de participanţi s-au întors numai 55. Cu toate că erau cunoscute perfect metodele de profilaxie ale acestei boli, numai peste 200 de ani ele au fost formulate concis şi aplicate de medicul englez Ling James (1753): "Nu o dată ne-am convins că legumele proaspete, fructele coapte şi zarzavaturile sunt cel mai benefic remediu şi cel mai efectiv mijloc pentru profilaxia scorbutului".

O dată cu apariţia cartofului în Europa, s-a micşorat brusc morbiditatea de scorbut (în ultimele luni ale iernii). În secolele XVI şi XVII, nomenclatoarele farmaciilor ruseşti includeau prepararea tincturii din pin şi măcieşi ca remediu contra scorbutului.

În secolul al XIX-lea s-a constatat corelaţia dintre alimentaţie şi evoluţia unor boli: în Italia (1804), G.Marzani a observat dependenţa pelagrei de consumul de porumb, stabilind că maladia este rezultatul unei raţii alimentare necomplete (lipsa unor vitamine şi proteine). Peste 12 ani, Magendi, experimental, foloseşte metoda de alimentare a animalelor tinere cu raţioane compuse din substanţe pure în scopul determinării influenţei lor asupra procesului de dezvoltare. Savantul a ajuns la concluzia că: "animalele nu pot rămîne sănătoase, dacă consumă doar substanţe de bază ce determină viaţa – zahăr, uleiuri şi albuminoase".

O etapă nouă în ştiinţă e legată de numele savantului rus N.Lunin (1881), care a procedat la următoarele: şoriceii experimentali, dacă erau hrăniţi cu lapte proaspăt, se comportau normal, iar cei hrăniţi artificial, cu componenţi ai laptelui plus apă, sufereau de tulburări grave şi pierceau în primele luni de experiment. Savantul a ajuns la concluzia că dacă nu poate fi asigurată viaţa doar cu proteine, lipide, glucide, săruri şi apă, apoi reiese că laptele mai conţine substanţe nutritive care reprezintă un interes deosebit pentru studiere. Datele experimentale ale savantului amintit au fost confirmate peste 10 ani de

C.Sosin, care a recurs la o variantă de dietă artificială.

Din notițele medicului danez J.de Bonitus (1630), reiese că *beri-beri* era cunoscută bine de localnicii de pe insula Java, însă numai peste 250 de ani japonezul T.Takaki a stabilit că boala ar putea fi prevenită, dacă marinarii japonezi ar fi micșorat cantitatea orezului curățat din rația alimentară și ar fi mărit cantitatea de carne, legume, lapte. În 1890 medicul G.Eijkman a observat că polinevrita nu afectează păsările hrănite cu orez necurățat și că extractul din tărîțele de orez tratează polinevrita atît la păsări, cît și la subiecții bolnavi. Conform altor date, extractul curativ din aceleași tărîțe a fost căpătat de Kazimierz Funk, savant polonez, care-l obține în formă cristalică – un amestec de vitamine. După proprietăți, constituie o substanță organică ce conține o grupă aminică, propunînd și denumirea acestor substanțe – ***vitamine*** (amină vitală). Mai tîrziu s-a constatat că multe substanțe din această clasă nu conțin grupa NH_2, dar și pentru acestea s-a menținut denumirea de ***v i t a m i n e.***

Vitaminele reprezintă o grupă de substanțe organice integrate în cantități minime în celule și asigură activitatea lor normală. Majoritatea lor provin din mediul extern, adică nu pot fi sintetizate de organism. În studiul vitaminelor, tractul digestiv este considerat un factor de mediu exterior, deoarece numeroase vitamine sunt produse, prelucrate sau consumate de către flora microbiană din intestin, modificînd aportul real al vitaminelor în organism.

Solicitările diurne de vitamine de către om sunt extrem de mici (micrograme) și, deci, vitaminele sunt niște microcomponente ale hranei, îndeplinind rolul catalitic în diferite modificări chimice. Aminele nu reprezintă sursă de energie, dar reglează indirect metabolismul prin diferite sisteme fermentative, fiind componente propriu-zise ale acestora. Acest fapt a fost sugerat, în 1922, de N. Zelinski.

Actualmente, cunoaștem toate vitaminele necesare pentru funcționarea normală a organismului uman. Necesitățile individuale de anumite vitamine variază în limita dependenței de rația alimentară, activitatea microflorei intestinale, factorii genetici. O dietă neadecvată poate provoca insuficiența unor astfel de vitamine ca: biotina, B_{12}, acidul pantotenic, vitamine sintetizate de flora bacteriană intestinală. Vitaminele atestate se conțin în celulele animale, ale majorității plantelor și ale microorganismelor, exercitînd unele și aceleași funcții biologice cardinale.

La momentul actual, în dependență de impactul insuficienței unei sau altei vitamine asupra sănătății omului, ele pot fi împărțite în două clase. O problemă destul de frecventă în multe țări este insuficiența de *tiamină, niacină, riboflavină, acid ascorbic și folic*, care afectează vădit populația. De insuficiență similară a acestor vitamine suferă și cetățenii țărilor dezvoltate. Cît privește insuficiența *acidului pantotenic, biotinei,* B_{12}, B_6, *vitaminelor A, D, E, K*, practic, se înregistrează foarte rar.

Carența vitaminelor în organismul uman poate fi cauzată de:

a) o alimentație insuficientă sau incompletă (alimentație deficitară), cu deficiențe ale aportului primar de vitamine sau ca urmare a distrugerii vitaminelor din alimente (la prelucrarea termică);

b) un catabolism intens al vitaminelor cauzat de alterarea florei microbiene, ce constituie o sursă importantă de vitamine pentru necesitățile organismului;

c) tulburările de absorbţie determinate de lezarea funcţiilor motrice şi secretoare ale intestinului;

d) afecţiunile ficatului şi ale pancreasului, ce deregleză absorbţia vitaminelor liposolubile;

e) imposibilitatea transformării provitaminelor în vitamine;

f) administrarea anumitor medicamente;

g) anumite stări fiziologice speciale sau patologice (perioada de evoluţie, graviditate, lactaţie, efort fizic, boli infecţioase, alcoolism cronic);

h) acţiunea antivitaminelor din mediu, ce se integrează în sistemele fermentative la fel ca şi vitaminele.

Studierea funcţiei biochimice a vitaminelor a contribuit la stabilirea ***antivitaminelor*** – substanţe ce inhibă efectul vitaminelor în celulele vii şi reflectă carenţa de vitamine. Distingem 2 grupe de antivitamine:

1) cu o structură asemănătoare vitaminei native. Efectul lor este bazat pe interacţiunea competitivă cu vitamina – concurenţa pentru centrul activ al enzimei, determinînd o inhibiţie competitivă;

2) antivitamine ce provoacă modificări de natură chimică ale vitaminelor şi, în consecinţă, diminuează sau suprimă complet efectul biologic.

Aşadar, prin termenul "antivitamină" se subînţelege orice substanţă ce provoacă, indiferent de mecanismul de acţiune, reducerea sau suprimarea completă a efectului biologic al vitaminelor. Antivitaminele cu o structură analogică reprezintă antimetaboliţi şi la interacţiunea cu apoenzima formează complexe fermentative neactive, cu repercusiuni respective. Majoritatea antivitaminelor sunt preparate medicamentoase cu un efect distinctiv asupra unor procese fiziologice şi biochimice. Se utilizează pe larg ca preparate anticancerigene sau antibacteriene, stopînd sinteza proteinelor şi a acizilor nucleici în celule.

Sunt specificate şi antivitamine de provenienţă biologică, inclusiv enzime, proteine, ce provoacă scindarea sau fixarea moleculelor vitaminice, deposedîndu-le de efectul fiziologic: *tiaminaza, ascorbatoxidaza, avidina* (proteină ce fixează biotina într-un complex neactiv).

Sunt frecvente stările de latenţă clinică, la care însemnele carenţei apar în momentul slăbirii organismului, din diferite motive. O insuficienţă globală scoate în evidenţa stări precarenţiale diferite, în dependenţă de antecedente, adică de "individualitatea biochimică" a persoanelor în cauză. Posibil că însemnele de carenţă a unei vitamine, cu evoluţie mai rapidă, maschează insuficienţa altor vitamine şi de aceea în clinică se înregistrează mai des manifestări policarenţiale.

Unele vitamine pot fi sintetizate parţial de către om şi alte mamifere (vit.PP, avînd ca precursor triptofanul). Flora intestinală sintetizează cantităţi substanţiale de vitamine (K, PAB, biotină, acid folic, acid pantotenic), care pot acoperi parţial necesităţile normale ale omului, pe cînd oferta celorlalte vitamine este insuficientă şi implică un surplus alimentar susţinut.

Metodele de dozare a vitaminelor

Scopul studiului este determinarea metodelor şi tehnologiilor variate utilizate în clinici, farmaceutică şi în nutriţie. Predomină metodele fizico-chimice şi biologice.

Metodele fizico-chimice: vitaminele dau colorație la interacțiunea cu diferiți compuşi chimici, şi intensitatea culorii e proporţională cu concentraţia vitaminelor. Unele vitamine au spectre de absorbţie caracteristice în UV sau vizibil, ce fac posibilă stabilirea cantităţii lor în alimente, umorile şi ţesuturile organismului uman şi al animalelor. Sunt utilizate cu succes şi metodele fluorimetrice (vit.B_1 şi B_2), titrimetrice (vit.C), polarografice, cromatografice şi altele, folosite pe larg în chimia analitică.

Testele biologice sunt menite să determine cantitatea minimă de vitamine necesară pentru profilaxie sau tratamentul simptomelor carenţiale respective. Această cantitate e stabilită ca unitate de măsură. *Testele microbiologice* au scopul de a determina viteza dezvoltării unor microorganisme în medii sintetice corelate cu concentraţia vitaminei. Cantitatea vitaminei e exprimată în unităţi internaţionale sau micrograme.

Vitaminele se clasifică în baza unui criteriu predominant:

a) solubilitatea în lipide şi solvenţi organici;

b) solubilitatea în apă şi solvenţi polari.

Vitaminele *hidrosolubile* necesită un aflux permanent din alimentaţie, deoarece sunt uşor eliminate din organism sau scindate în urma unor ordinare reacţii fermentative. În urma consumării unor alimente bogate în vitamine sau a unei terapii intensive, saturate cu vitamine hidrosolubile, ele vor fi eliminate din organism evitînd consecinţele cauzate de incapacitatea de a fi depozitate în organe. Excesul vitaminelor *liposolubile* (alimente sau preparate) în organism cauzează hipervitaminoze, cu manifestări chimice diferite: de la forme uşoare pînă la veritabile “intoxicaţii” cu vitamine.

Încă de prin anii 30 s-au depistat funcţiile biochimice distinctive ale unor vitamine. În 1935, biochimistul german Otto Warburg a stabilit structura coenzimei necesare pentru cataliza unor reacţii de oxidoreducere în celulă (NADP). Savantul a constatat că una din componentele acestui complex e o substanţă organică simplă – *nicotinamida* – extrasă din tutun. Fiind moleculă de structură simplă, majoritatea animalelor nu o sintetizează în cantităţi suficiente şi e nevoie de un aport exterior. Ulterior, s-a consolidat conceptul că şi alte vitamine funcţionează ca părţi active ale coenzimelor şi ale grupelor prostetice enzimatice. Vitaminelor li se atribuie un rol deosebit în procesele biochimice dinamice, în interacţiunile dintre metaboliţi şi antimetaboliţi, ce stau la baza dezvoltării chimioterapiei moderne.

În prezent se acordă o importanţă deosebită interacţiunilor dintre vitamine-vitamine, vitamine-hormoni, vitamine-medicamente, care se realizează prin efecte de sinergie, potenţare sau diminuare a acţiunii vitaminelor şi, respectiv, a hormonilor şi medicamentelor.

VITAMINELE HIDROSOLUBILE

Vitamina B_1

Se mai numeşte şi «tiamină» datorită structurii sale chimice (conţine un nucleu tiazolic). Sub formă de sare, este o substanţă solidă, cristalizată, incoloră şi solubilă în apă. Este relativ stabilă în soluţii acide, dar se inactivează rapid prin încălzire în soluţii neutre sau alcaline. Sub acţiunea diferitor oxidanţi, tiamina este transformată în tiocrom; fluorescenţa albastră a acestui compus serveşte la dozarea tiaminei.

Răspîndirea şi sursele. Este prezentă în cantităţi mari în drojdia de bere, dar şi în cortexul boabelor de cereale, cum ar fi grîul, secara şi orezul. Pîinea de grîu integrală este o excelentă sursă de tiamină. Este de asemenea prezentă în unele legume ca mazărea, fasolea, spanacul, precum şi în unele fructe ca nucile, strugurii şi în carne. Majoritatea ţesuturilor animale, mai ales produsele din carne de porc, sunt importante surse de tiamină. Deşi concentraţia de B_1 în lapte este relativ scăzută, şi el e o importantă sursă de tiamină, mai ales consumat în cantitate mare.

Rolul biochimic. Tiamina indusă alimentar este absorbită uşor la nivelul intestinului subţire şi dusă mai ales în ficat, rinichi şi inimă. Aici are loc transferul direct al pirofosfatului din ATP pe tiamină în prezenţa ionilor Mn^{2+}, formîndu-se tiaminpirofosfatul (fig.7.18).

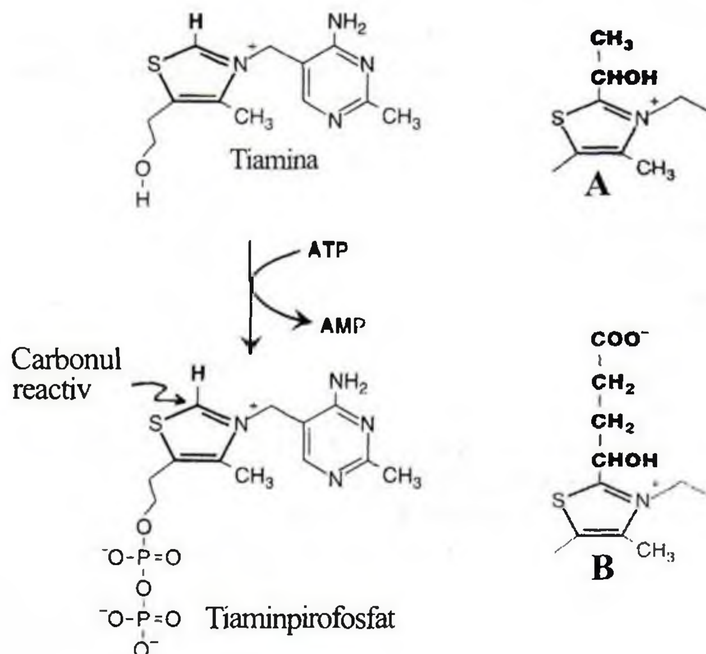


Figura 7.18. ***Structura tiaminei şi a tiaminpirofosfatului. Structuri intermediate formate în reacţiile catalizate de: A - piruvat dehidrogenază şi B - α-cetoglutarat dehidrogenază***

Tiaminpirofosfatul mai este cunoscut şi sub numele de *cocarboxilază*, deoarece are rol de coenzimă în reacţiile de decarboxilare oxidativă a α-cetoacizilor (piruvic, α-ceto-glutaric etc.) şi în reacţia de transcetolare, ambele deosebit de importante în metabolismul glucidic (fig.7.19).

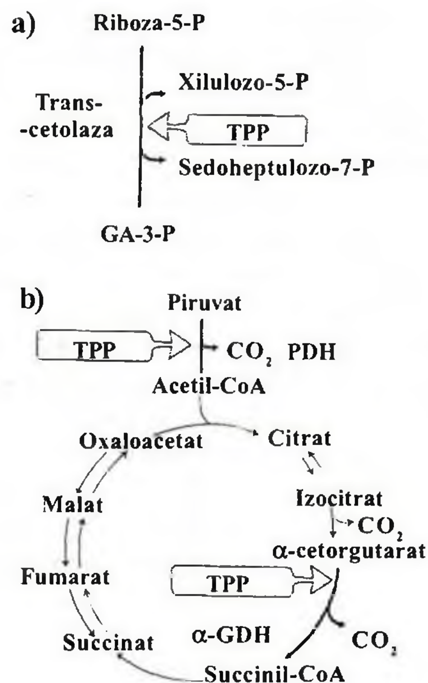


Figura 7.19. ***Reacţiile cu participarea TPP drept coenzimă:*** **a) *- transcetolaza şi* b)*-piruvat- şi α-cetoglutarat dehidrogenaza***

S-a demonstrat că după administrarea de tiamină animalelor de experienţă, o parte din ea poate fi regăsită în urina neschimbată şi, o altă parte, ca piramină (4-amino-5-hidroximetil-2-metilpirimidina). Aceasta din urmă se presupune că ar deriva din tiamină sub acţiunea tiaminazei, prezentă mai degrabă în microorganismele intestinale, decît în ţesuturi. Creşterea activităţii tiaminazei poate modifica necesarul de vitamină.

La indivizii normali, care ingerează 0,5-1,5 mg tiamină zilnic, s-a constatat o eliminare urinară de 50-250 μg vitamină în 24 ore.

Necesarul zilnic şi carenţa de vitamină B_1. Necesarul zilnic de vitamină s-a dovedit a fi de 1,0-1,5 mg care variază cu alimentaţia. Astfel, atît lipidele, cît şi proteinele exercită o acţiune de economisire a tiaminei. Deoarece tiaminpirofosfatul conţinut în ţesuturile animalelor cu o dietă bogată în lipide este în cantitate considerabil mai mare decît în cazul animalelor cu o dietă bogată în glucide, s-ar putea presupune că lipidele ar cruţa, într-un anumit fel, tiamina.

Consumul de tiamină poate fi uşor mărit prin folosirea în alimentaţie a mazării, fasolei, a pîinii intergale, precum şi a practicilor de gătit. Se ştie că fierberea excesivă duce la scăderea conţinutului de tiamină a multor preparate.

Necesarul de tiamină creşte la persoanele care depun o activitate fizică intensă sau la un consum mărit de glucide. În sarcină, alăptare, ca şi în diverse stări patologice ca febră, diaree, stres, se impune un consum mărit de tiamină.

Carenţa de tiamină duce la «beri-beri», boală ce a fost răspîndită pe larg în zonele unde orezul decorticat a constituit hrana de bază a oamenilor. Maladia dată este cunoscută sub două forme: «uscată» şi «umedă». Forma «uscată» este caracterizată prin pierderea rapidă în greutate, atrofie musculară şi tulburări nervoase. În cea «umedă», edemele generalizate pot masca slăbirea organismului. Apar afecţiuni cardiace care evoluează rapid. Beri-beri «umed» răspunde bine la administrarea de tiamină, constatîndu-se normalizarea funcţiilor cardiace şi diureză masivă. Deficitul de tiamină este mai frecvent la alcoolicii cronici.

Cel mai eficient test de deficiență a tiaminei la om prezintă determinarea nivelului *transcetolazei* eritrocitare.

Vitamina B_2.

Este cunoscută şi sub numele de *riboflavină* sau *lactoflavină.* Aceste denumiri sunt datorate, pe de o parte, structurii sale de flavină, iar pe de altă parte faptului că a fost izolată din lapte.

Riboflavina este o substanță solidă, cristalizată, de culoare galbenă, puțin solubilă în apă. La acțiunea razelor violete sau ultraviolete prezintă o fluorescență galben-verzuie, pe care însă o pierde în soluții puternic acide sau puternic bazice. Această proprietate serveşte drept bază la dozarea riboflavinei în diverse medii biologice.

Prin iradierea cu raze ultraviolete în soluție alcalină, riboflavina formează *lumiflavina,* iar dacă această iradiere are loc în mediu acid, se formează *lumicromul* caracterizat printr-o intensă fluorescență albastră.

Răspîndirea şi sursele. Cantități însemnate de B_2 se conțin în ficat, drojdia de bere, boabele de grîu, precum şi în legumele cu frunze verzi cum ar fi varza, spanacul etc. În mare măsură, la asigurarea necesarului de riboflavină în dieta umană constituie laptele, ouăle şi carnea. Comercial, este obținută din culturile de mucegai, care produc vitamina, cu un randament mare.

Rolul biochimic. Riboflavina este sintetizată de plantele verzi, bacterii şi ciuperci, dar nu şi de animale. Cercetările au demonstrat că toți atomii de carbon şi azot ai guaninei, cu excepția C_8 al nucleului purinic, sunt folosiți pentru sinteza riboflavinei.

Vitamina B_2, produsă din aport alimentar este absorbită uşor la nivelul intestinului subțire, iar sîngele o distribuie în tot organismul, cantități mici fiind depozitate în ficat şi rinichi.

Prin reacția cu ATP riboflavina formează în organism două substanțe deosebit de importante: *flavinmononucleotid* (FMN) şi *flavinadenindinucleotid* (FAD) (fig.7.20).

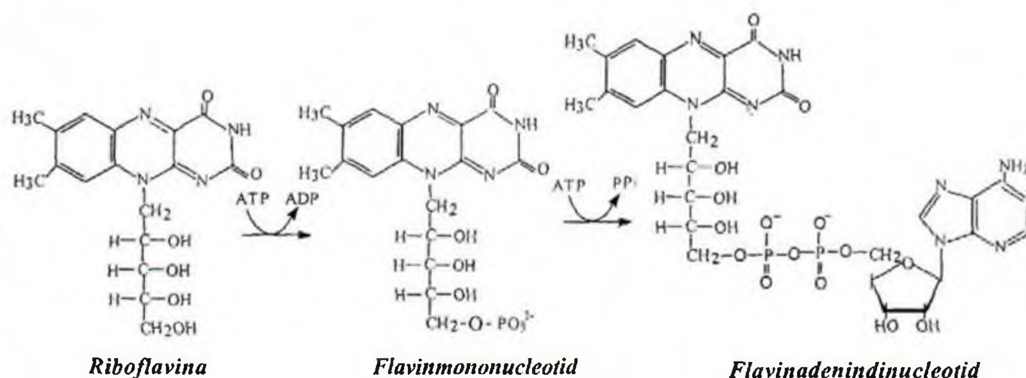


Figura 7.20 ***Structura şi biosinteza FMN şi FAD***

FAD se sintetizează din riboflavină şi două molecule de ATP. În prima etapă se formează *riboflavin-5-fosfatul (FMN),* care prin reacție cu o a doua moleculă de ATP generează FAD.





Necesarul zilnic și carența de vitamină B_2. Pentru un adult sănătos necesarul zilnic de riboflavină este de 1,2-1,7 mg. Crește în perioada sarcinii și a alăptării.

Riboflavina nu este cunoscută ca factor etiologic primordial în nici una din maladiile umane grave, deși pacienții cu pelagră, beri-beri și altele suferă de o insuficiență de B_2. Deficiențele de vitamină se caracterizează printr-o colorație violetă a limbii, fisuri ale colțului gurii și buzelor, oboseală oculară, dilatarea pupilei și sensibilitatea ochiului la lumină, modificări de vascularizație la nivelul corneii, tremurături, tulburări digestive etc. Toate aceste manifestări apar însă și în alte deficiențe, cum ar fi cele provocate de lipsa de niacină și fier, de aceea este greu de precizat care din aceste tulburări sunt cauzate de carența de riboflavină și cînd deficiențele de riboflavină apar la subiecții normali.

Carența riboflavinei în eritrocite este cel mai sensibil indiciu al carenței acestuia în organismul uman; normal, sîngele conține aproximativ 20 μg/dL riboflavină.

Vitamina B_5, vitamina PP.

Ca vitamină, acidul nicotinic este cunoscut sub numele de *niacină*; denumirea de PP derivă de la pelagra-preventiv, adică factor de prevenire a pelagrei. Aceeași acțiune antipelagroasă o are și *nicotinamida*.

Niacina este o substanță solidă, cristalină, incoloră, solubilă în apă și soluții alcaline. Nicotinamida sau niacinamida este o substanță solidă, cristalină, incoloră, solubilă în apă.

Răspîndirea și sursele de niacină. Este prezentă în cantități considerabile în produsele de carne, mai ales în ficat, în drojdia de bere, făină integrală și în unele legume ca fasolea, soia, mazărea, cartofii etc.

Rolul biochimic. Biosinteza niacinei are loc aproape în toate organismele, de la plante pînă la oameni. Reacția de transformare a triptofanului în nucleotidul acidului nicotinic este caracteristica organismelor animale. Plantele verzi și numeroasele microorganisme prezintă o altă alternativă de sinteză, despre care se știe doar că folosesc ca substanță de pornire aspartatul și un derivat al triozelor.

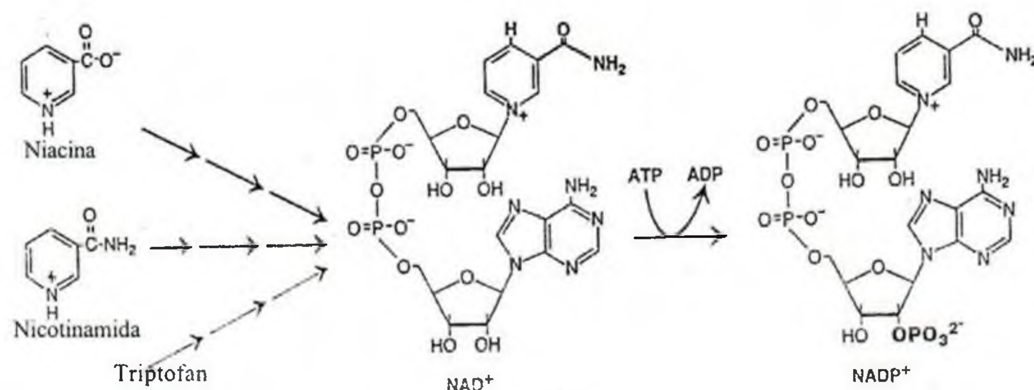


Figura 7.21. *Structura și biosinteza NAD⁺ și NADP⁺*

Vitamina PP alimentară - este absorbită la nivelul intestinului subţire şi depozitată pentru scurt timp în ficat. De aici, se răspîndeşte în tot organismul, participînd la procesele de oxido-reducere sub forma celor două coenzime: NAD^+ şi $NADP^+$ (fig.7.21).

Necesarul zilnic şi carenţa. Hipervitaminoza. Necesarul zilnic este de 13-19 mg, fiind mai crescut la bărbaţi decît la femei, iar la copii – în perioada de creştere. Nevoile de vitamină sunt mai mari în perioada de sarcină, de alăptare şi în efort fizic crescut. Deoarece sinteza vitaminei PP se datorează triptofanului, necesarul de niacină al omului şi animalelor poate fi completat în baza acestui aminoacid. Într-o alimentaţie echilibrată de carne care conţine triptofan, carenţa de vitamină este mai rar întîlnită, pe cînd într-o alimentaţie bogată în făină de porumb care este foarte săracă în triptofan, apar deficienţe de niacină, cauzînd *pelagra*.

Pelagra reflectă, probabil, nu numai deficienţe de niacină, dar şi ale altor componente din complexul B, precum şi deficienţa de proteine în dietă. Boala se caracterizează prin dermatite ale zonelor expuse la soare, stomatite, limba plină de răni, digestie dificilă şi diaree. În cazuri severe, întregul tract intestinal poate prezenta hemoragii; sunt frecvente dereglările sistemului nervos central, ajungîndu-se la demenţă. Boala este cunoscută sub numele de «boala celor trei D-uri» (Dermatită, Diaree, Demenţă).

Excesul de NAD^+ este îndepărtat prin ruperea legăturii glicozidice de la nucleul piridinic, sub acţiunea unei enzime numite NAD^+-glicohidrolază, generîndu-se nicotinamida şi ADP-riboza. În continuare, nicotinamida este hidrolizată de o nicotinamidază, formîndu-se acidul nicotinic reutilizat la sinteza NAD^+-ului. Cantităţi mari de nicotinamidă se formează la creşterile concentraţiei NAD^+-ului hepatic. În aceste situaţii, revenirea la normal este realizată cu ajutorul tranchilizanţilor de tipul rezerpinei sau promazinei, sau prin hipofizectomie; mecanismele prin care intervine ultimul proces sunt necunoscute.

În ficat, nicotinamida suferă o reacţie ireversibilă de metilare, cu formarea de *N-metilnicotinamidă*, principalul produs de catabolizare a niacinei, prezent în urină. Acest produs a fost folosit pentru diagnosticarea carenţei de nicotinamidă. N-metilnicotinamida este oxidată de o aldehidoxidază în ficatul numeroaselor mamifere, precum şi al omului, cu formarea 6-piridonei corespunzătoare, care apoi este eliminată prin urină.

Vitamina B_6.

Se mai numeşte *piridoxină* sau adermină. Denumirea de piridoxină se datorează structurii sale (conţine un alcool cu nucleu piridinic), iar cea de «adermină» este legată de capacitatea sa de a vindeca o dermatită specifică dezvoltată la şobolanii tineri hrăniţi cu alimente lipsite de vitamine.

Vitamina B_6 face parte din complexul B. *Piridoxalul, piridoxol şi piridoxamina* – toate au aceleaşi efecte asupra organismului şi alcătuiesc împreună vitamina B_6.

Piridoxina este o substanţă solidă, cristalină, incoloră, solubilă în apă şi în unii solvenţi organici; clorhidratul piridoxalului se prezintă sub forma unor cristale rombice solubile în apă şi mai puţin solubile în alcool, în timp ce clorhidratul piridoxaminei cristalizează în plăcuţe higroscopice uşor solubile în apă şi greu solubile în alcool.

Surse de vitamina B_6 sunt boabele cerealelor, gălbenuşul de ou, drojdia de bere, legumele şi carnea (mai ales ficatul şi rinichii).

Rolul biochimic. Vitamina B_6 este absorbită uşor la nivelul intestinului şi trece în sînge, care o duce în tot organismul; cantităţi mici de vitamină sunt depozitate în muşchii scheletali.

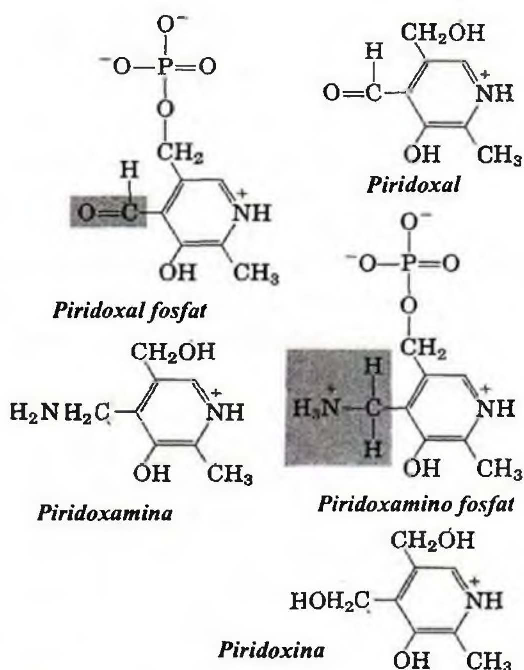


Figura 7.22. ***Structura vit. B_6 şi a formelor sale active***

În citoplasma majorităţii celulelor, dar mai ales a celulelor hepatice, componentele vitaminei B_6 sunt fosforilate sub acţiunea unei kinaze specifice, graţie ATP-ului, formîndu-se esterii fosforici corespunzători. Dintre aceştia, piridoxalfosfatul şi piridoxaminfosfatul au rol de coenzime, participînd la numeroase reacţii din organism (fig.7.22).

Omul şi şobolanul îşi completează necesarul de vitamină B_6 pe seama piridoxinei sintetizate de flora microbiană intestinală, sinteză stimulată de alimentaţia bogată în amidon şi dextrine şi inhibată de glucoză. După absorbţia la nivelul intestinului, piridoxina este oxidată la piridoxal şi fosforilată la PLP, sub acţiunea piridoxalkinazei. În afecţiuni renale, piridoxalkinaza este inhibată. Deşi aportul de vitamină B_6 este corespunzător, se poate ajunge la o carenţă de PLP.

În organism, vitamina B_6 şi esterii săi participă la numeroase procese de importanţă excepţională. Amintim degradarea glicogenului, sinteza hemului, formarea anticorpilor, sinteza acizilor nucleici, procesele de transaminare, menţinerea echilibrului ionic Na^+/K^+, funcţionarea normală a sistemului nervos şi muscular, sinteza histaminei, serotoninei, vitaminei PP din triptofan etc.

Necesarul zilnic şi carenţa de vitamină B_6. Se estimează că necesarul zilnic de vitamină normal este de 1,4-2,0 mg pentru un adult. La dietă bogată în proteine, precum şi cu vîrsta (în anumite stări fiziologice, afecţiuni hepatice şi cardiace, în expuneri la radiaţie) cerinţele cresc.

Deşi o avitaminoză pură este rar întîlnită la om, insuficienţa vitaminei B_6 e determinată de apariţia unor simptome caracteristice: stare de nervozitate, dureri la nivelul membrelor, reţinerea apei în organism, tulburări de mers, dureri abdominale, dermatite, căderea părului, tulburări de vedere, artrite, anemie, afecţiuni cardiace etc.

Într-o alimentaţie cu deficit de vitamina B_6, dezoxipiridoxina determină leziuni cutanate, mai ales în jurul nasului, ochilor şi gurii, precum şi alterări ale limbii.

La sugarii hrăniţi cu lapte sau alimente fierte timp îndelungat la temperaturi ridicate, se constată convulsii epileptiforme şi hiperexcitabilitate, atribuite în special deficitului de

glutamat decarboxilază şi, implicit, de acid γ-aminobutiric. Deoarece PLP participă la biosinteza hemului, se presupune că o carenţă de PLP ar determina o anemie trecătoare, care ar diminua administrarea de vitamină.

Simptome ale carenţei de vitamină B_6 apar la administrarea *izoniazidului*, un medicament folosit în tratamentul tuberculozei. Se pare că izoniazidul formează cu piridoxalul şi esterul său fosforic o hidrazonă care se elimină prin urină, făcîndu-le astfel indisponibile pentru reacţiile enzimatice.

La şobolani, carenţa de vitamină se manifestă prin încetinirea creşterii şi apariţia unei dermatite caracteristice denumită acrodinie, caracterizată prin inflamaţia şi descuamarea pielii extremităţilor. La tineretul porcin, cîini şi şobolani duce la o creştere a conţinutului de fier în plasmă şi hemosideroză. Şobolanii cu deficit de vitamină sunt sensibili la zgomot şi manifestă accese epileptice.

Excesul de vitamină B_6 este rar întîlnit. Cînd se produce scade absorbţia intestinală a vitaminei. De asemenea, supradozarea piridoxinei inhibă fosfokinazele implicate la transformarea tiaminei în TPP.

Acidul pantotenic (B_3).

Compus larg răspîndit în majoritatea ţesuturilor vegetale şi animale, fiind vitamină pentru om şi animale şi factor de creştere pentru microorganisme.

Din punct de vedere structural, acidul *pantotenic* este format din acid *pantoic* şi *β-alanină*, unite prin legătură peptidică (fig.7.23).

Este un ulei galben, vîscos, solubil în apă şi acid acetic, puţin solubil în alcool, benzen, cloroform. Este stabil la pH uşor acid şi neutru, dar instabil la încălzire. Sarea sa, *pantotenatul de calciu*, este o substanţă solidă, cristalină, solubilă în apă, glicerină şi acid acetic, greu solubilă în alcool şi insolubilă în cloroform, eter, benzen.

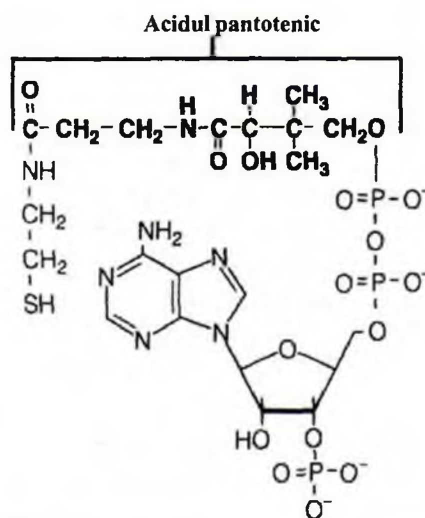


Figura 7.23. ***Structura coenzimei A***

Sursele. Este prezent în alimentele care conţin celelalte componente ale complexului B; deosebit de bogate sunt drojdia de bere, ficatul şi ouăle. Carnea şi laptele sunt surse importante, pe de o parte, datorită conţinutului de vitamină, iar pe de altă parte, datorită cantităţii consumate. Majoritatea legumelor şi fructelor sunt surse sărace de acid pantotenic.

Rolul biochimic. Acidul pantotenic alimentar este absorbit uşor la nivelul intestinului şi dus de către sînge la toate organele, unde este fosforilat în baza ATP-ului. Apoi, printr-o serie de reacţii succesive, se obţine *coenzima A*.

Rolul coenzimei A este multiplu, participînd în procesele de biosinteză şi degradare. În toate aceste procese, ea participă prin gruparea -SH a tioetilaminei, care este capabilă să formeze legături macroergice, tioesterice. Coenzima A degradează în *acid pantotenic*

şi cisteamină, ultima transformîndu-se în *hipotaurină*. Unele microorganisme (*E.coli*) au capacitatea de a realiza integral biosinteza acidului pantotenic. Omul şi animalele superioare nu pot sintetiza acidul pantoteinic, prin urmare, sunt incapabile să realizeze sinteza coenzimei A. Acidul pantotenic produs de aportul alimentar va servi ca sursă pentru sinteza coenzimei A.

În creier, lipseşte kinaza specifică care catalizează transformarea pantotenatului în 4-fosfopantotenat. Ca urmare, în acest organ concentraţia pantotenatului rămîne constantă, iar sinteza coenzimei A nu are loc.

Necesarul zilnic şi hipervitaminoza. Potrivit unor autori, necesarul zilnic de acid pantotenic este de 5-10 mg, conform altora – de 10-15 mg sau chiar de 30-50 mg. Necesarul de acid pantotenic creşte mult în stres. Deficienţa de acid pantotenic la om nu a fost evidenţiată, dar s-a constatat că prezenţa acidului pantotenic în alimente este esenţială pentru toate speciile investigate.

La şobolani, deficienţa de acid pantotenic se caracterizează prin încetinirea creşterii, slăbirea funcţiei de reproducere, colorarea în gri a părului şobolanilor albi etc.

În anumite stări patologice la om, carenţa de acid pantotenic se caracterizează prin vărsături, dureri abdominale, crampe musculare, infecţii ale căilor respiratorii superioare, sensibilitatea organismului la infecţii, în general etc. De asemenea, pot apărea modificări cutanate şi scăderea funcţiei suprarenale, ceea ce induce hipoglicemie, reducerea capacităţii fizice, afecţiuni ale sistemului nervos etc. Unele concluzii indică o strînsă dependenţă între scăderea concentraţiei acidului pantotenic şi predispoziţia la artrite reumatice.

Biotina (Vitamina H).

Este vitamină pentru om şi animale şi factor de creştere pentru drojdie, ciuperci şi bacterii. Structura sa include un ciclu imidazolic condensat cu unul tiofenic, la acesta din urmă fiind ataşat radicalul acidului valerianic.

Prezintă o substanţă cristalină, incoloră, solubilă în apă. În mediu acid sau bazic se descompune, dar este stabilă la încălzire.

Sursele. Biotina este foarte răspîndită în hrană. Ficatul rumegătoarelor şi drojdia sunt cele mai bogate surse. Arahidele, ciocolata, gălbenuşul de ou, laptele, tomatele etc. sunt de asemenea surse bogate de biotină.

În condiţii normale, biotina este furnizată mamiferelor în cantităţi suficiente prin sinteza de către flora microbiană intestinală. Aşa se explică faptul că eliminarea de biotină prin urină şi fecale depăşeşte aportul alimentar.

Rolul biochimic. Sinteza biotinei a fost studiată în baza unei varietăţi de mucegaiuri şi bacterii. Reacţiile ce par a explica cel mai bine sinteza biotinei la *E.coli* şi la alte organisme pornesc de la acidul pimelic activat, format pe seama acidului oleic. Originea atomului de sulf nu e cunoscută. Întregul şir de reacţii este suprimat de prezenţa biotinil-5-adenilatului. Biotina aportată alimentar este absorbită uşor la nivelul intestinului subţire. În organism, îndeplineşte roluri foarte importante, participînd la metabolismul lipidic, glucidic, precum şi la alte reacţii în care are rol de fixare a CO_2 pe diferiţi intermediari.

În enzimele ce conţin biotină, aceasta este legată covalent, sub forma unei legături amidice, la gruparea ε-amino a unui rest de lizină din apoenzimă, ceea ce implică activarea

biotinei în prezența ATP, urmată de cuplarea cu proteina pentru a forma holoenzima (fig.7.24).

Prin proteoliza enzimelor ce conțin biotină, se eliberează ε-biotinil-lizina sau biocitina. În ficat și sînge s-a evidențiat o enzimă numită biocitinază, care eliberează biotina și lizina. La mamifere catena laterală a biotinei suferă o β-oxidare obișnuită, generînd doi moli de acetil-CoA.

Necesarul zilnic și carența de biotină. În baza rezultatelor obținute prin studiul șobolanilor, se estimează că cerințele umane de biotină ar fi 10 μg/zi. În alte literaturi se dau valori mult mai mari (150-300 μg/zi), deși nu există cerințe reale de biotină. Aceasta se explică prin faptul că în condiții normale biotina este sintetizată suficient de bacteriile intestinale.

În albușul de ou crud există o proteină numită *avidină* care are capacitatea de a forma o combinație stabilă, ireversibilă cu biotina. Ca urmare biotina devine ineficientă pentru organism și pot apărea simptomele carenței. Prin încălzire, avidina se inactivează, iar efectele asupra biotinei dispar.

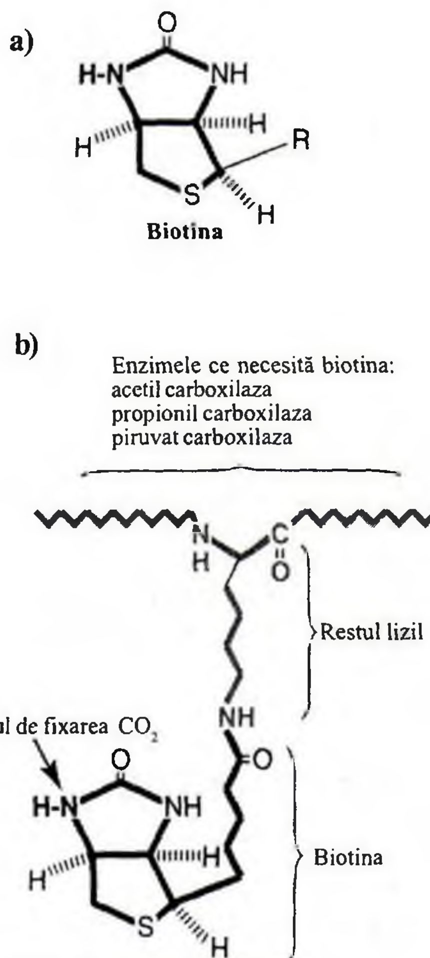


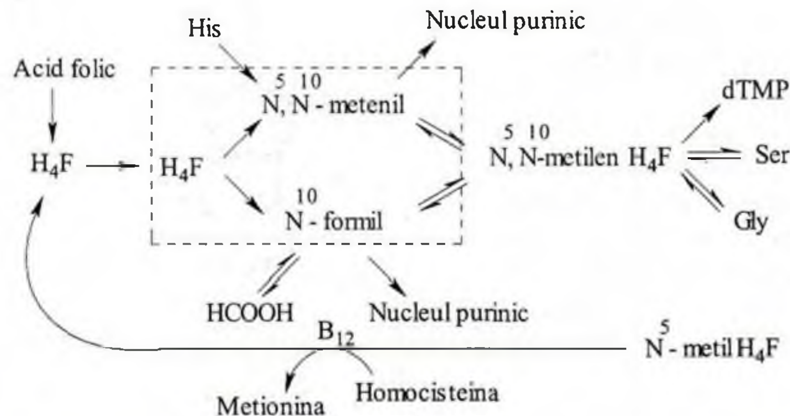
Figura 7.24. *Fixarea biotinei în enzime. a)-structura biotinei, b)- fixarea biotinei în enzime*

Carența de biotină la șobolani se manifestă prin dermatite, paralizii, căderea părului în jurul ochilor etc. La om, carența de biotină se manifestă prin dermatite, oboseală, dureri musculare, insomnii, depresii nervoase. Administrarea unor cantități mici de biotină înlătură în scurt timp efectele carenței.

Acidul folic.

Molecula acidului folic conține *acid glutamic*, acid *p-aminobenzoic și o pteridină*. Denumirea sa se explică prin faptul că această substanță se găsește în cantități mari în frunzele de spanac și are un caracter acid. Acidul folic produs de *E.coli* și cel prezent în țesuturile numeroaselor mamifere conține preponderent 5 resturi de acid glutamic unite prin legături γ-glutamil. Se mai cunosc însă și alți acizi folici: pteroil-triglutamic (cu trei resturi de acid glutamic) și pteroil-heptaglutamic (cu 7 resturi de acid glutamic).

Acidul folic (pteroil-monoglutamic) este o substanță cristalină, de culoare galbenă, puțin solubilă în apă, solubilă în soluții alcoolice diluate.



Sursele. Este larg răspîndit în floră şi faună. Surse bogate de acid folic sunt: drojdia, ficatul, rinichii, peştele şi plantele cu frunze verzi.

Rolul biochimic. Privind biosinteza acidului folic, s-a constatat că pteridina se obţine pe seama GTP-ului, iar gruparea amino a acidului p-aminobenzoic provine din Gln.

Biosinteza are loc la unele microorganisme, inclusiv din flora intestinală şi, în cantităţi mult mai reduse, din ţesuturile unor animale. Transformarea acidului folic în compuşi activi, ca şi la coenzime, are loc în organismul omului şi al animalelor şi necesită prezenţa acidului ascorbic.

Acizii pteroil-poliglutamici datoraţi aportului alimentar sunt hidrolizaţi în intestin, sub acţiunea unor enzime specifice numite folilpoliglutamat hidrolaze, pînă la acid folic. Urmează absorbţia care este un proces complex: o parte a acidului folic se absoarbe ca atare în circulaţie, dar cea mai mare parte este hidrogenat, în celulele peretelui intestinal, la acid tetrahidrofolic, urmat de o metilare la N^5, formîndu-se N^5–CH_3–FH_4. Sîngele îl duce la ficat, de unde este repartizat la ţesuturi prin circulaţia sistemică. În plasmă, CH_3–FH_4 circulă legat de o proteină specifică. Nivelul plasmatic al folaţilor scade în carenţa de acid folic, anemie pernicioasă, ciroză hepatică, leucemii.

Acizii tetrahidrofolici, în special N^5– formil–FH_4, reprezintă coenzimele unor sisteme implicate în procese deosebit de importante pentru organism ca: biosinteza bazelor purinice, a timinei, conversia glicinei la serină, homocisteinei la metionină, transformarea colaminei în cholină, biosinteza proteinelor etc. În aceste procese acizii tetrahidrofolici participă la transferul unor grupări C_1-active ca: metil, hidroximetil, formil, formimino de la un compus la altul. Rolul metabolic al acidului folic (şi al vitaminei B_{12}) în metabolismul fragmentelor poate fi redat în felul următor: Unităţile C_1-active transportate de tetrahidrofolat sunt interconvertibile. În acest proces intervin serina, formiatul, ATP, NADH,H^+, NADP etc.(fig.7.25)

Necesarul zilnic şi carenţa de acid folic. Cerinţele normale de acid folic în dietă sunt de 50 μg/zi, dar din cauza slabei absorbţii, doza zilnică recomandată este de aproximativ 400 μg/zi. O creştere a cantităţii pînă la 600-800 μg/zi este recomandată în graviditate, alăptare, stări de stres şi anumite stări patologice.

Acidul folic reprezintă un factor de creştere pentru numeroase organisme, participînd la sinteza acizilor nucleici şi, implicit, la diviziunea celulară.

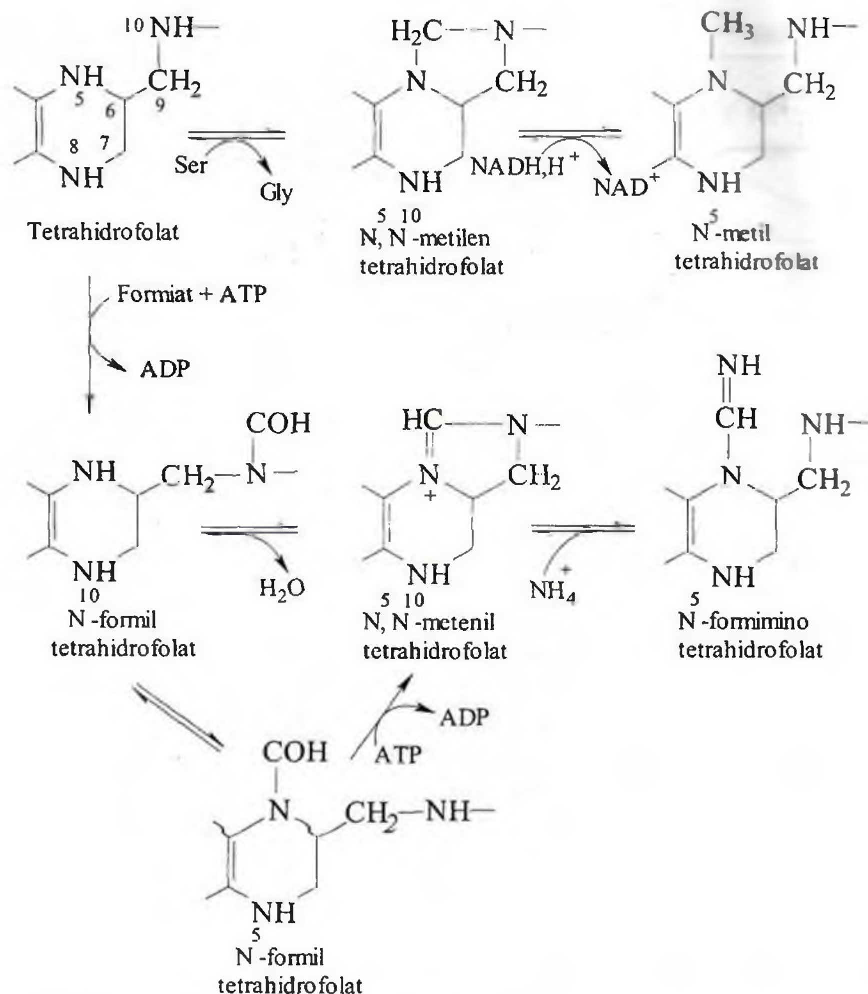


Figura 7.25. ***Interconversia grupelor monocarbonice***

Deci, carența acidului folic este caracterizată prin întreruperea creșterii, leucopenie, anemie, pierdere în greutate etc. Deficiența la animale nu apare numai în cazul unei diete lipsite de acid folic; la șobolani, spre exemplu, carența de acid folic poate apărea mai degrabă prin introducerea de *sulfonamide* în dietă, probabil ca rezultat al inhibării sintezei acidului folic în flora microbiană intestinală.

Utilizarea acidului folic în anemiile umane a condus la creșterea numărului de globule roșii și sinteza hemoglobinei. Un rol important pentru reținerea folaților în organism o are vitamina B_{12}, de aceea, carența acesteia determină un deficit secundar de acid folic. Vitamina B_{12} condiționează formarea formil-FH_4.

Vitamina B_{12}.

Numită și *cobalamină* este vitamină pentru om și animale, precum și factor de creștere pentru microorganisme. Structura vitaminei este complexă (fig.7.26).

Ciano-cobalamina, forma cea mai stabilă a vitaminei B_{12}, este o substanță solidă, cristalizată sub forma unor ace de culoare roșie-închisă, solubilă în apă, stabilă la temperaturi ridicate.

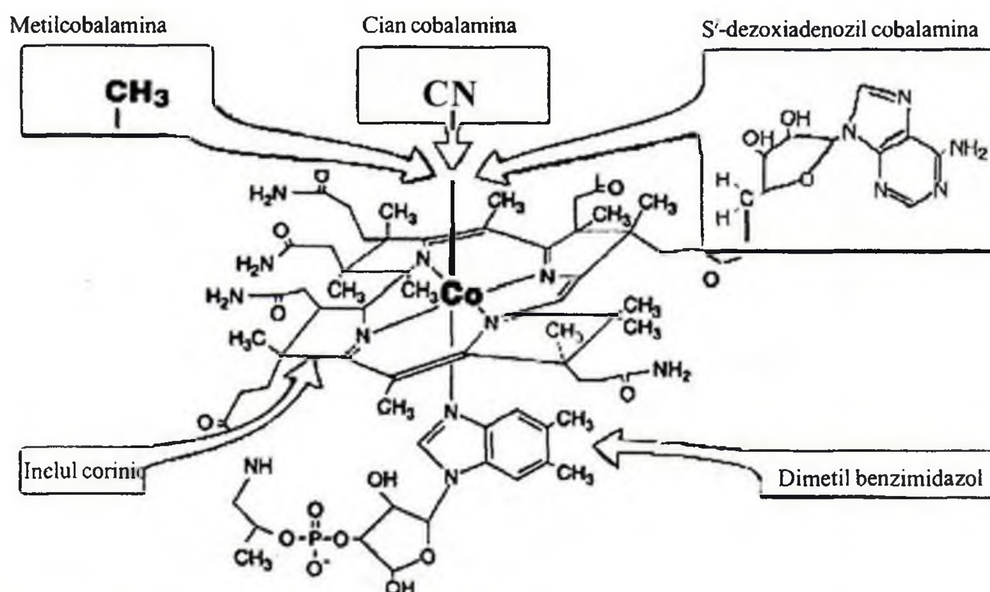


Figura 7.26. ***Structura vit. B12 şi a altor forme coenzimatice***

Sursele. Vitamina B_{12} este larg răspîndită în produsele de carne, mai ales în ficat, rinichi, muşchi, în produsele de peşte, precum şi în cele lactate.

Rolul biochimic. Vitamina B_{12} alimentară este eliberată în intestin, după care se uneşte cu un factor secretat de celulele mucoasei gastrice şi este absorbită. După absorbţie, acest factor este eliberat şi vitamina B_{12} este preluată de o proteină transportatoare specifică din plasmă numită *transcobalamină* (fig.7.27). În această formă este dusă la diverse ţesuturi, mai ales la ficat, unde este depozitată. Aici complexul cu transcobalamină se desface, şi vitamina B_{12} este eliberată sub formă de *hidroxocobalamină* $B_{12a}(Co^{3+})$. În citozol, acest compus reacţionează cu ATP şi formează coenzima B_{12}.

Acţiunea vitaminei B_{12} se relevează în două direcţii:

1. Are rol de coenzimă pentru unele transferaze, cum ar fi transmetilaza care catalizează transformarea homocisteinei în metionină.

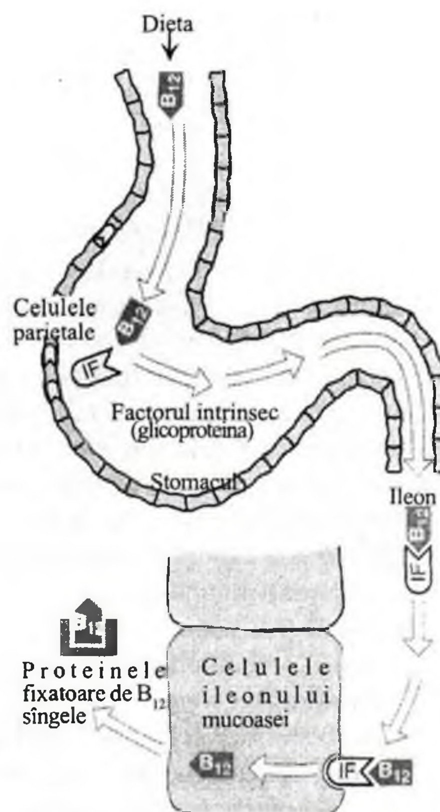


Figura 7.27. ***Absorbţia vit. B_{12}***

2. Unele izomeraze sau mutaze conțin coenzima B_{12}(fig.7.28).

Caracteristica comună a acestor reacții este transferul unui atom de hidrogen de la carbonul C_1 la carbonul C_2. Acest transfer este însoțit de transferul invers, de la C_2 la C_1 a unei alte grupări ca: hidroxil, amino, alchil, carboxil etc., conform reacției:



$$-HC_1- + C_2X- \longrightarrow -XC_1- + C_2H-$$

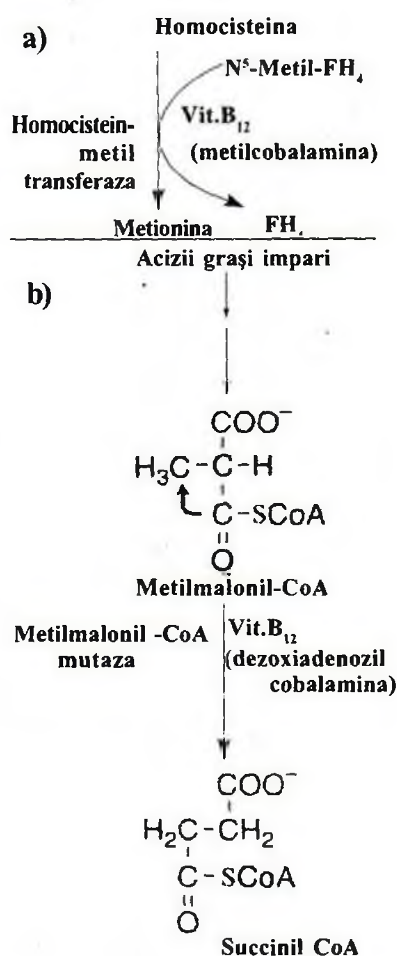


Figura 7.28. *Reacții reglate cu participarea vit. B_{12} drept cofactor*

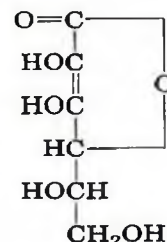
Necesarul zilnic și deficiența vitaminei B_{12}. Plantele și animalele nu pot sintetiza vitamina B_{12}, numai cîteva microorganisme au această capacitate. Necesarul zilnic de vitamină B_{12} este de 3 μg pentru adulți și copii mici și de 1 μg pentru copiii mai mari. Crește în stări fiziologice, ajungînd pînă la 4 μg/zi.

Această vitamină reprezintă una din cele mai active substanțe: administrarea de numai 1 μg de vitamină B_{12} unui bolnav de anemie pernicioasă conduce la activarea puternică și imediată a hematopoiezei.

Vitamina B_{12} este considerată factorul antipernicios, deoarece carența ei cauzează *anemia pernicioasă* denumită și *boala Biermer*. Această maladie este o anemie macrocitară, hipercromă, însoțită de tulburări nervoase, cu scăderea reacțiilor reflexe, tulburări de vorbire, mers, digestive. Anemia pernicioasă se datorează incapacității măduvei de a produce globule roșii normale. În aceste cazuri, globulele sunt primitive și au viață scurtă. Pentru producerea globulelor roșii normale e nevoie de un factor antipernicios care se formează în urma interacțiunii dintre un factor extrinsec cum este vitamina B_{12} din alimente și un factor intrinsec produs de mucoasa gastrică. Drept factor intrinsec servește o *glicoproteină* cu specificitate absolută, aflată în mod normal în sucul gastric. La unii bolnavi de anemie pernicioasă, mucoasa gastrică nu produce factorul intrinsec. Acest fenomen poate fi suplimentat prin aport alimentar de ficat.

Menționăm faptul că există patru tulburări metabolice ereditare caracterizate prin incapacitatea organismului de a folosi vitamina B_{12} cu rol de coenzimă. În două din aceste maladii este afectată numai sinteza dezoxiadenozil cobalaminei, iar în celelalte două s-a pus în evidență incapacitatea de formare a dezoxiadenozil cobalaminei, fie a metilcobalaminei.

Vitamina C (acidul ascorbic).



Acidul ascorbic a fost izolat în stare cristalină din sucul de lămîie de către biochimiştii americani C.King şi N.Waugh în 1932. Denumirea provine de la faptul că este o substanţă cu caracter acid şi vindecă boala numită scorbut. Această boală provocată de carenţa vitaminei C se întîlneşte la om, precum şi la unele maimuţe, cobai, lilieci, deoarece acestor organisme nu le este caracteristic capacitatea de a sintetiza acidul ascorbic.

Acidul ascorbic este o substanţă cristalină, uşor solubilă în apă, cu caracter acid. Dintre vitaminele hidrosolubile, vitamina C este cea mai puţin stabilă. Ea este sensibilă mai ales la încălzire, fiind însă stabilă la temperaturi scăzute, chiar la cele de îngheţare a produselor care o conţin.

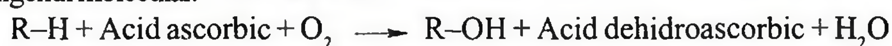
Răspîndirea şi sursele. Scorbutul se datorează lipsei de legume şi fructe proaspete din hrană, care sunt surse bogate de viatmina C, mai ales cele cu frunze verzi ca: tomate, spanac, varză, ardei, cartofi noi. Concentraţii mari de vitamină sunt în citrice, pepene galben, măcieş şi, în cantităţi mici, în lapte şi carne, mai ales în urma prelucrării termice.

Rolul biochimic. Vitamina C se absoarbe rapid la nivelul intestinului. Diferiţi factori au însă capacitatea de a scădea sau chiar de a împiedica absorbţia vitaminei C. Printre aceştia sunt: antibioticele, cortizonul, aspirina, medicamentele calmante, fumul, în special cel de ţigară, stresul şi temperaturile ridicate.

Acidul ascorbic eliberat în lumenul intestinal sub formă de acid dehidroascorbic suferă o reducere în peretele intestinal, fiind absorbit în circulaţie sub formă de acid ascorbic. Organismul reţine din aportul alimentar numai cantitatea strict necesară, restul fiind eliminată prin urină.

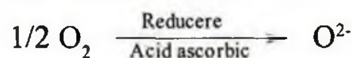
Eliminarea de oxalat urinar, ca şi formarea oxalatului de calciu insolubil, poate fi atribuită în parte acidului ascorbic, deoarece în organism o cantitate din acesta se transformă în acid oxalic.

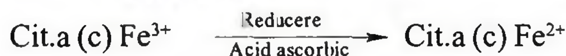
Majoritatea reacţiilor în care participă acidul ascorbic sunt hidroxilările la care participă oxigenul molecular.

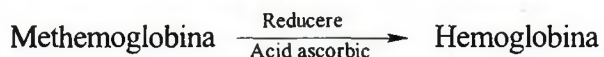


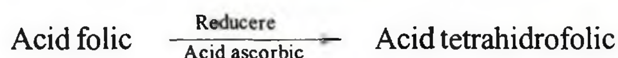
Dar acidul ascorbic intervine în numeroase procese – prin reacţii de reducere, iar acidul dehidroascorbic – prin reacţii de oxidare.

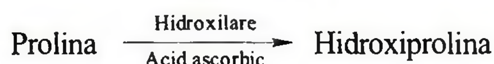
Iată cîteva exemple:

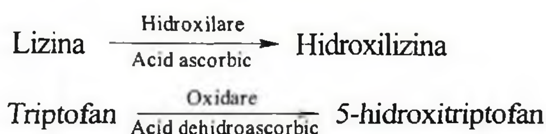












O importanță deosebită la formarea hidroxiprolinei şi hidroxilizinei (aminoacizi specifici colagenului) o are acidul ascorbic. Dacă acest proces nu are loc, se obține un colagen sărac în cei doi aminoacizi, imatur, solubil, cu consecințe ce rezultă de aici.

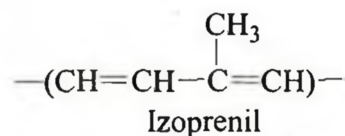
Pe lîngă reacțiile menționate, acidul ascorbic intervine şi în alte reacții de oxido-reducere în care funcționează cuplat cu glutationul sau coenzimele nicotinamidice şi flavinice. Acidul ascorbic are un rol important la degradarea oxidativă a tirozinei, precum şi la formarea hormonului medulosuprarenal-adrenalina. În ambele procese, vitamina C are rol de activator al anumitelor enzime.

Necesarul zilnic şi carența. Necesarul zilnic de vitamină C al omului sănătos este de 1 mg acid ascorbic/kg/corp, care variază la efortul fizic, starea de sănătate şi stările fiziologice speciale ale organismului. În cazul unor boli cum ar fi cele virale, printre care şi gripa, perioadele de stres, tulburările cardiovasculare, aportul de vitamină C trebuie majorat considerabil.

Excesul de vitamină poate duce la efecte toxice ca: erupții pe diverse regiuni cutanate, usturime la urinare, formarea calculilor de oxalat de calciu, iar la nivelul tubului digestiv poate determina încetinirea absorbției altor vitamine, în special, a vitaminei B_{12}.

Carența de vitamină C are numeroase manifestări semnificative. Scorbutul la adulți se manifestă prin răni, pierderea dinților, scăderea integrității capilare cu hemoragii subcutanate şi edeme, dureri articulare, anorexie şi anemie. La copii, scorbutul duce la dureri, umflarea articulațiilor, dificultăți în mişcare, hemoragii, dezvoltarea insuficientă a dinților, încetarea dezvoltării scheletului şi apariția de boli osoase caracteristice, cicatrizarea încetinită a rănilor şi anemie. La fel, carența de vitamină C poate avea loc în organismul fumătorilor, indiferent de faptul că aportul alimentar este suficient. Cauza acestui fenomen este, pe de o parte, fumul de țigară care împiedică absorbția vitaminei C, iar, pe de altă parte, *nicotina* care scade considerabil concentrația vitaminei C în sînge.

VITAMINELE LIPOSOLUBILE



Această grupă de vitamine se formează în sistemele biologice prin adiția izoprenei-2 (metilbutadiena), ce joacă rolul unui bloc de construcție în sinteza diferitelor substanțe lipo- și cauciuco-asemănătoare de natură vegetală.

Nu sunt determinate funcțiile biochimice ale tuturor vitaminelor (A,D,E,K,F). Una din proprietățile de bază constă însă în capacitatea lor de a se depune în cantități însemnate ca rezervă în organism, iar carența lor în rația alimentară poate să nu se manifeste timp îndelungat.

Vitamina A (retinol, vitamina antixeroftalmică).

Rolul vitaminei A ca factor esențial al nutriției a fost elucidat de E.McCollum (1915), mai tîrziu savantul a izolat retinolul din extractele lipidice ale ficatului de pește. Există două forme de vitamina A: A_1 (retinolul) depistat în ficatul peștilor maritimi și A_2(are în plus o legătură dublă în inel) izolată din ficatul peștilor de rîu. Ambele forme reprezintă polialcooli (20 atomi de C), compuși din ciclul ionic, 2 resturi de izopren și o grupă primară alcoolică (fig.7.29).

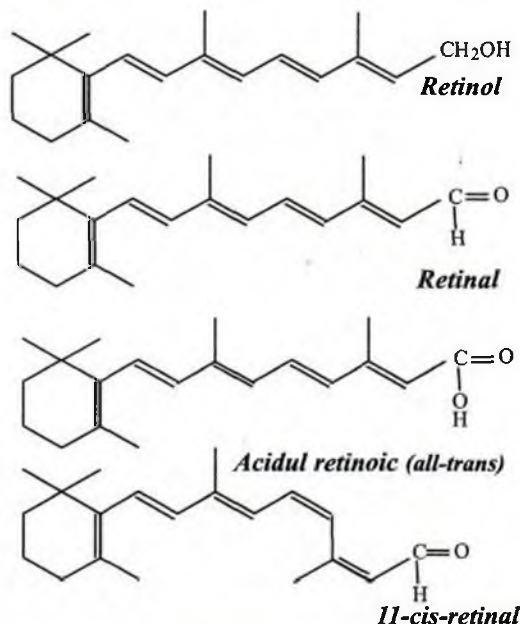
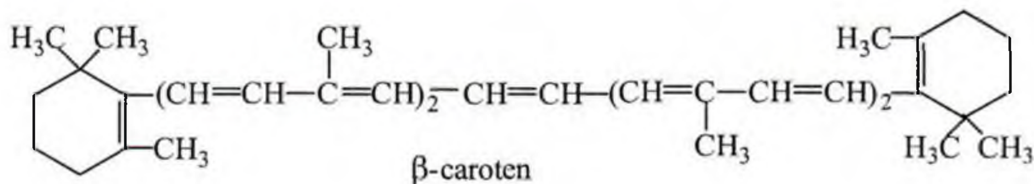


Figura 7.29. ***Structura retinoizilor***

Omul și unele specii de animale nu pot sintetiza vitamina A, dar pot transforma unii caroteni provitaminici în formă activă, astfel și necesitățile organismului sunt satisfăcute de acest aport de vitamine oferite de natură.

Substanțele de natură izoprenică denumite carotenoizi – *provitamine*, pot fi transformate în vitamina A, pe cale fermentativă, în organismul majorității animalelor.

Din β-caroten care, avînd o moleculă simetrică în condiții fiziologice, se formează două molecule de vitamina A, ceilalți caroteni (α și γ) produc o singură moleculă cu o eficiență de 2 ori mai redusă. Sistemul legăturilor duble ale carotenilor este oxidat ușor de către O_2, cu subminarea activității vitaminice. Oxidarea în produsele naturale este inhibată de prezența antioxidanților (vit.E).



Locul preferențial de transformare a β-carotenului în retinol este mucoasa intestinului, însă enzima *carotenaza* e situată şi în ficatul unor animale. Enzima e o dioxigenază ce conține Fe, inhibată de reagenții ce fixează fierul şi interacționează cu grupele SH.

Absorbția carotenilor are loc prin mecanisme similare cu cele ale lipidelor, dar se produc destul de lent şi incomplet, reprezentînd doar 10% din aportul alimentar. Resorbția vit.A are loc la acelaşi nivel la care este în prealabil esterificată de acizi graşi cu catenă lungă, apoi transferată în vasele limfatice, după care, asociată cu chilomicronii, pătrund în sînge. Retinolul este transportat în sîngele omului de către o proteină specifică de legare a retinolului (RBP), fiind o α-globulină (fig.7.30).

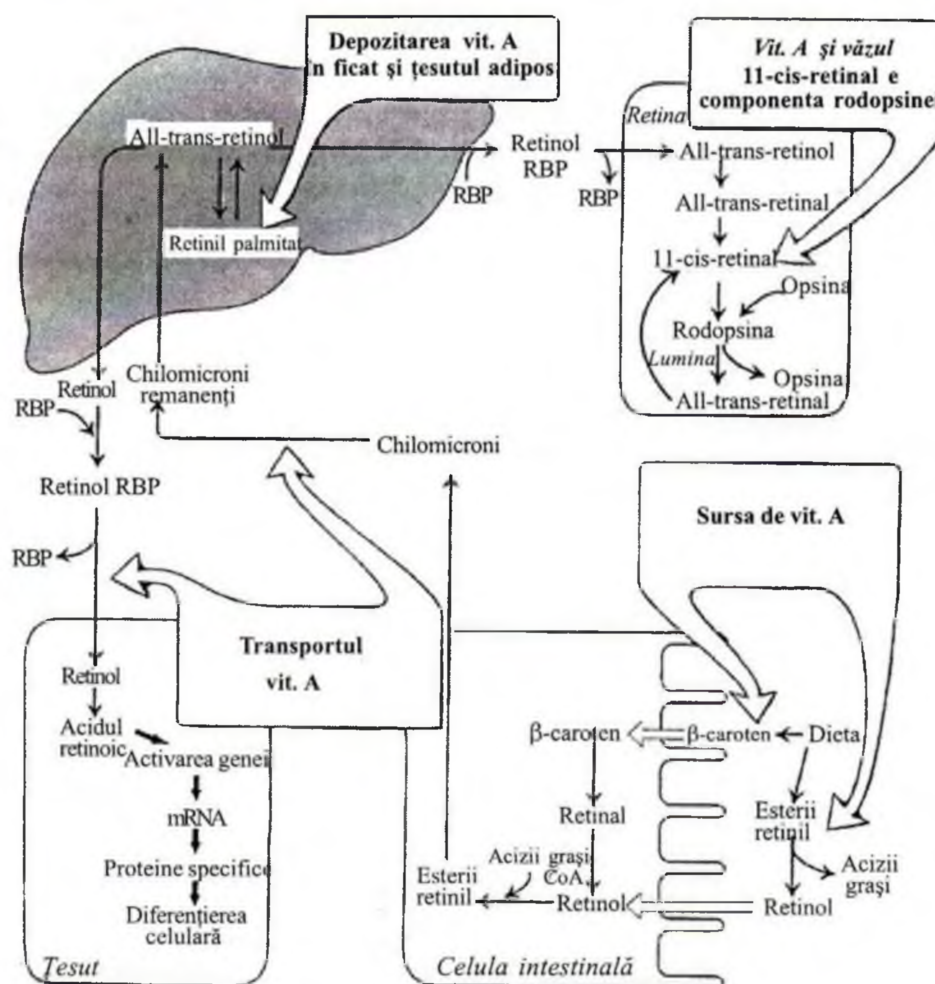


Figura 7.30. ***Absorbția, transportul şi depozitarea vit.A şi a derivaților ei. RBP – proteină fixatoare de retinol***

Depozitarea în ficat se efectuează în formă de esteri ai retinolului, cu implicarea enzimei vitamin A esteraza. Activitatea acestei enzime e inhibată de NaF, compuşi ai arseniului. Ficatul unor peşti oceanici, al ursului polar conține foarte multă vitamină A.

Complexul proteină-retinol se fixează pe suprafața horioidală a celulelor pigmentate epiteliale ale retinei care, posibil, asigură cu retinol receptorii specifici.

Studiul fundamental biochimic şi biofizic asupra funcției vitaminei A, elaborat de către George Wald de la Universitatea Harvard, a determinat complet rolul acesteia în procesele fotochimice ale vederii. Ciclul de modificări chimice ale pigmentului vizual, *rodopsina* în bastonaşele retinei, ar putea fi următorul: celulele percep semnalele luminii de o intensitate mică, nu sunt sensibile la culori. Rolul componentului activ în acest proces îl joacă forma oxidată a retinolului – *retinalul*, aldehida vit.A, fixată de proteina *opsină*. Acest complex numit rodopsină este prezent şi absolut identic în toți pigmenții vizuali, inclusiv în conuri; în bastonaşe e aranjată în formă de stive în membranele intracelulare. 11-cis-retinolul (o singură legătură dublă în poziția 11 are conformație cis, celelalte sunt în trans) absoarbe lumina şi, în urma unei modificări intramoleculare foarte complicate, dar rapide, este izomerizat complet în trans-retinal. Are loc o alterare marcantă a geometriei moleculei rodopsinei, modificări conformaționale. Rodopsina naturală are aproximativ 60% din structura sa în formă helicală şi, sub influența luminii, aproximativ 1/5 din ea se pierde. La un moment anumit al transformărilor date se produce desfacerea complexului, cu eliberarea trans-retinalului de pe molecula opsinei, deoarece aceasta nu poate lega decît izomerul 11-cis-retinal (fig.7.31).

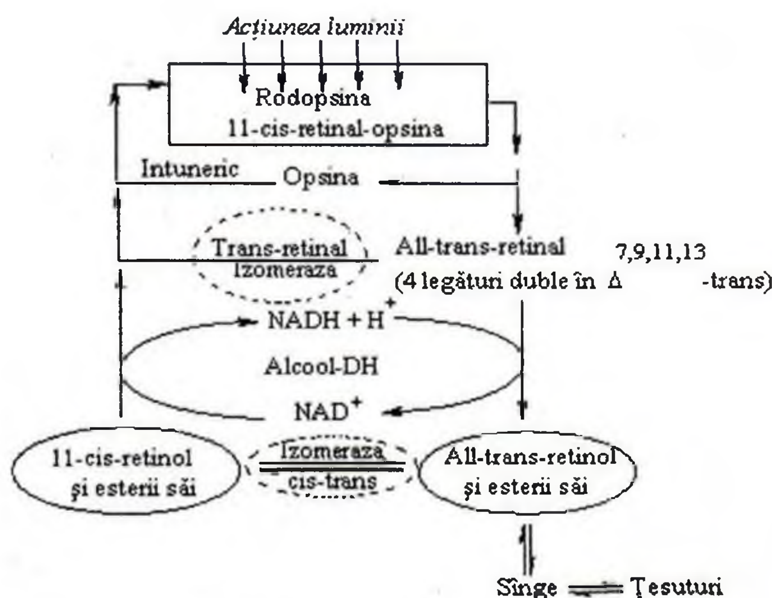


Figura 7.31. ***Modificările în ciclul rodopsinei***

În procesul de transformare 11-cis- în all-trans-retinal se înlătură impedimentul steric impus de legătura 11-cis şi, astfel, electronii suplimentari ai dublelor legături se pot deplasa în aceeaşi direcție în izomerul trans, la o anumită distanță. Aceste modificări servesc ca mecanism molecular declanşator, la care această cuantă de lumină generează un impuls în extremitățile nervului optic. În procesul fotosintezei se formează

mai multe produse intermediare, ce au diferită conformaţie şi se deosebesc după proprietăţile speciale (rodopsina, batorodopsina, lumirodopsina, metarodopsina I şi II, opsina). Cuanta de lumină provoacă o hiperpolarizare-impuls a membranei plasmatice pe segmentele externe. Cinetica acestui proces e dependentă de intensitatea luminii şi de nivelul stabilităţii ei de fon. Lumina, printr-un mecanism, blochează coloanele de Na în membrana plasmatică. Semnalul se transmite prin intermediul mediatorilor defundabili. Experimentele ne conving că aceştia pot fi Ca^{++} şi GMPc. Mecanismele de reglare a conţinutului de GMPc în bastonaşe au obţinut progres. Lumina nu acţionează asupra guanilatciclazei (GC), dar are un efect neobişnuit asupra FDE, amplificînd activitatea aceştia de sute de ori.

Stimulaţia GC de către rodopsina fotoexcitată ® e determinată de proteina reglatoare-*transducina* (T). La întuneric, transducina conţine o moleculă de GDP fixată rigid de subunitatea α sub forma trimerului inactiv (α,β,γ). Rodopsina activată se leagă de T şi determină schimbarea GDP la GTP (T -GTP), şi rodopsina e aptă să se implice într-un nou tur de reacţii conform schemei (fig.7.32).

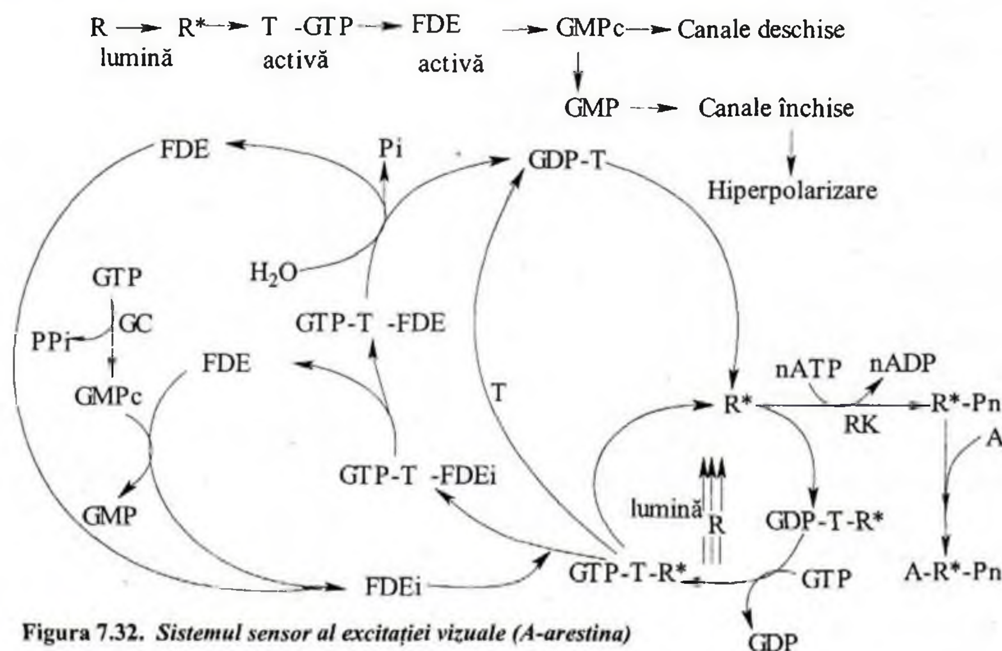
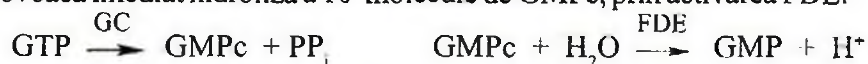


Figura 7.32. ***Sistemul sensor al excitaţiei vizuale (A-arestina)***

Forma activă a T interacţionează cu FDE, care, la întuneric, este sub forma unui heterotrimer inactiv.

Mediatorul GMPc are un rol primordial în funcţionarea canalelor de Na^+- la majorarea concentraţiei de GMPc canalele se deschid şi invers. Fotoliza unui molecule de R provoacă imediat hidroliza a 10^5 molecule de GMPc, prin activarea FDE.



$$GTP \xrightarrow{GC} GMPc + PP_i \qquad GMPc + H_2O \xrightarrow{FDE} GMP + H^+$$

Rodopsina este inactivată printr-o fosforilare efectuată de o *kinază specifică (RK)* urmată de legarea formei fosforilate de *arestină*, un inhibitor puternic ce împiedică legarea

rodopsinei de transducină. În absența luminii, nivelul GMPc se reface sub acțiunea *guanilatciclazei*.

Mecanismele de amplificare a semnalelor nu sunt elucidate complet, dar e cert că proprietățile membranei plasmatice se hiperdereglează (hiperpolarizare) atunci cînd doar o singură moleculă dintr-un milion este excitată de un foton. La întuneric, au loc reacții fermentative reversibile de formare a pigmentului vizual. Acidul retinoic ce se formează la oxidarea retinolului ($CH_2OH \longrightarrow COOH$) poate înlocui parțial retinolul din rația alimentară la șobolani. Stimulează creșterea oaselor, țesuturilor moi, formarea spermei, dar nu poate funcționa în procesul vederii, nu-i utilizat la dezvoltarea embrionului (fig.7.33). Surplusul de acid retinoic nu se depozitează în organism și este eliminat ca compuși glucoziduronidici, prin bilă.

Legăturile duble ale vitaminei presupun un rol deosebit în diferite reacții de oxido-reducere, de altfel sunt reglatori ai permeabilitații membranare; manifestă efect antagonist cu tiroxina (extirparea glandei tiroide favorizează depozitarea vitaminei A în organism), cortizolul inhibă transformările carotenoizilor în vitamina A. Carența vitaminei A blochează căile de transformare a pregnenolonei, și în consecință se majorează cantitatea ei.

De menționat rolul vitaminei A la oxidarea acizilor grași, biosinteza gliceridelor, fosfolipidelor, colesterolului și, respectiv, a hormonilor steroizi. La insuficiența ei, apare hiperlipemia și hipercolesterolemia (la șobolani). Un conținut susținut de glucide din rația alimentară micșorează conținutul hepatic al vitaminei A. Referitor la metabolismul proteic, vitamina A favorizează asimilarea purinelor și sinteza acizilor nucleici, participînd la regenerarea nucleelor, la biosinteza proteinelor în procesul dezvoltării și cicatrizării. Incontestabil că vit.A sau un metabolit al ei reduce sinteza keratinei prin inhibarea formării legăturilor disulfidice, conferind scleroproteidelor o rezistență specifică. Sumar acțiunea retinoizilor este redată în fig.7.34. Vitaminele A și E sunt sinergice. La om și animale se înregistrează o echivalență de nivel a vitaminelor A și C. Posibil că vitamina A are și alte funcții, dar metabolismul ei nu e cunoscut.

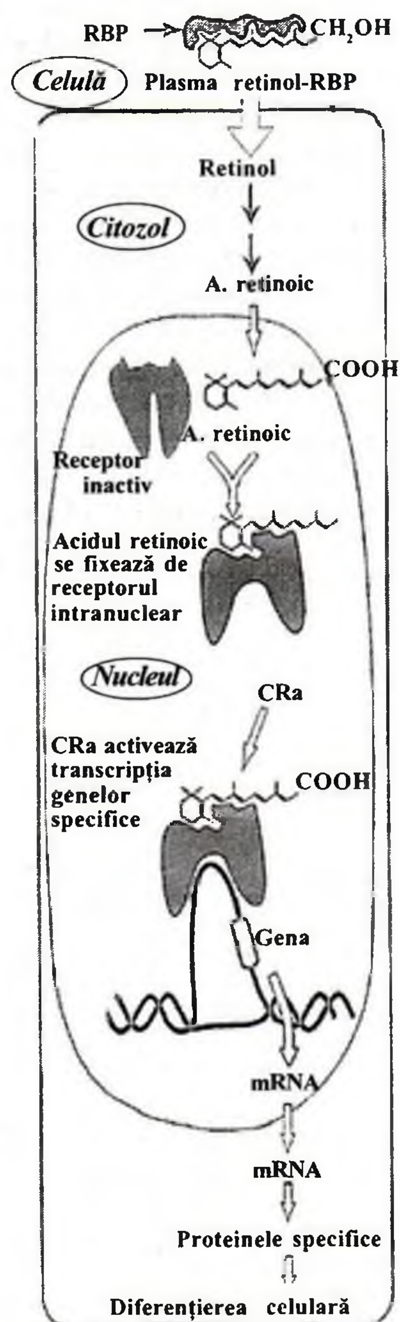


Figura 7.33 ***Mecanismul de acțiune al retinoizilor (RBP-proteina fixătoare de retinol)***

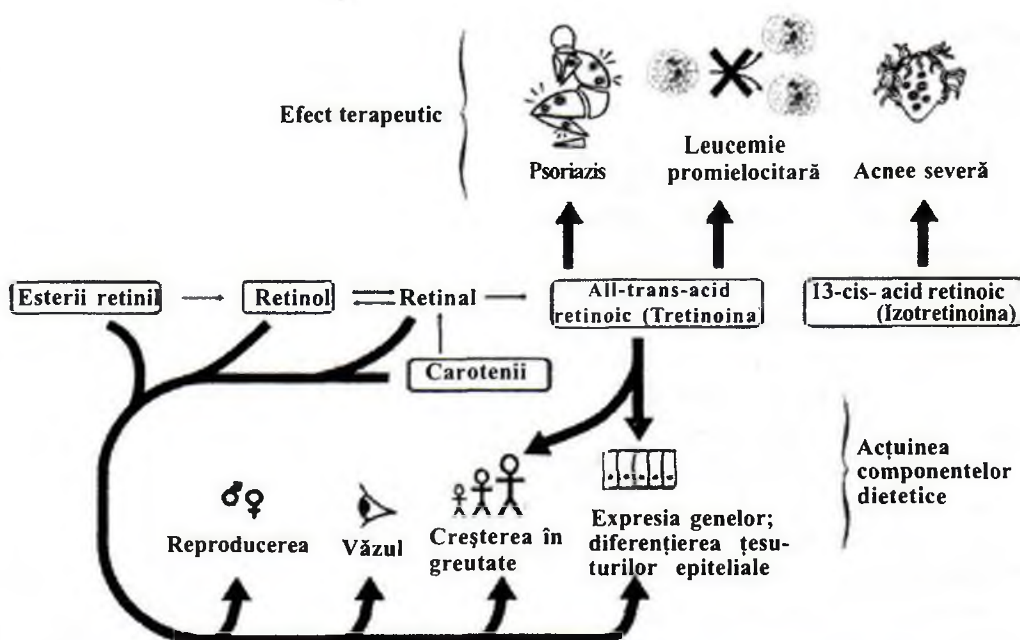


Figura 7.34. ***Efectul sumar al retinoizilor (preparate farmacologice sau componente dietetice)***

Carenţa de vitamina A. Semnele precoce semnificative ale carenţei de vitamina A se manifestă:

1) la nivelul ochilor, cu apariţia gradată şi progresivă a unor tulburări funcţionale şi morfologice. Se reduce gradul de adaptare de la lumină la întuneric (*nictalopia*), scade capacitatea vizuală şi are loc îngustarea spectrului vizibil (*hemeralopia*);

2) se înregistrează stagnarea diviziunii celulare şi atrofia celulelor deja formate din ţesutul conjunctiv – se deregleaza sinteza condroitin sulfatului, consecinţă a amplificării activităţii sulfatazice în lizozomi. Deteriorarea amplasării şi dereglarea activităţii osteoblaştilor şi osteoclaştilor se manifestă prin stagnarea creşterii oaselor şi a ţesuturilor (nervos), ceea ce implică comprimarea creierului, măduvei osoase, majorarea tensiunii lichidului cefalorahidian;

3) se observă *metaplazia keratinizantă* a celulelor epiteliale, indiferent de originea lor, cu dereglări ale funcţiei glandelor exocrine (lacrimale – xeroftalmia, keratomalacia); din piele, tractul digestiv, respirator şi urogenital. Acumularea celulelor keratinizate în canalele glandulare cauzează apariţia chisturilor, ocluziilor, abceselor, calculilor, iar la masculi – a sterilităţii. Un simptom caracteristic la om este formarea pe piele a papulelor hiperkeratozante, cu obturarea canalelor glandelor, reducerea excreţiei sudoripare şi sebacee, pînă la cazuri grave – "*frenodermie*" (piele de broască rîioasă), extinsă pe tot corpul, cu excepţia feţei, palmelor şi a tălpilor (la o insuficienţă a complexului de vitamina B);

4) carenţa este însoţită şi de reducerea vădită a rezistenţei şi protecţiei active faţă de microorganismele patogene – apar diferite stări febrile şi dereglări ale aparatului respirator.

Simptomele carenţei vitaminei A sunt mai evidente la organismele tinere (om, animal): modificările în schelet şi în sistemul nervos se observă numai la organismele în creştere,

fapt cauzat de lipsa vitaminei A, depozitată în ficatul nou-născuților; pe cînd la maturi rezervele de vitamină în ficat pot satisface cerințele organismului timp de cîțiva ani. Pentru exemplificare: administrarea a 30 mkg de vitamina A îi satisface copilului cerințele pe o perioadă de 6 luni. Doza minimă diurnă, ce menține concentrația adecvată a vitaminei în sînge și preîntîmpină simptomele carenței, este de 600-700 mkg (2000-2500 UE) retinol sau cantități duble de β-caroten.

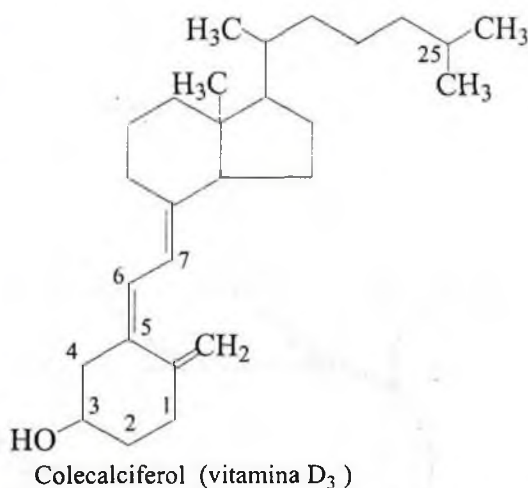
Cantitățile excesive de retinol provoacă fenomene toxice. Mulți exploratori ai Arcticii au decedat după ce au consumat ficatul ursului polar. Fenomene toxice se înregistrează și la utilizarea excesivă a preparatelor vitaminice, ce se caracterizează prin:

a) *la copii:* hiperostoză doloră, înțepenirea mușchilor, erupții cutanate, cefalee; b) *la adulți:* depresie, somnolență, greață, dermatită, calcinoza structurilor pericapsulare ale ligamentelor; c) *în timpul graviditășii* - modificări native, cauzate de efectul enzimelor hidrolitice ce se eliberează din lizozomii celulelor condroitale – o repercusiune a surplusuliu de vitamina A.

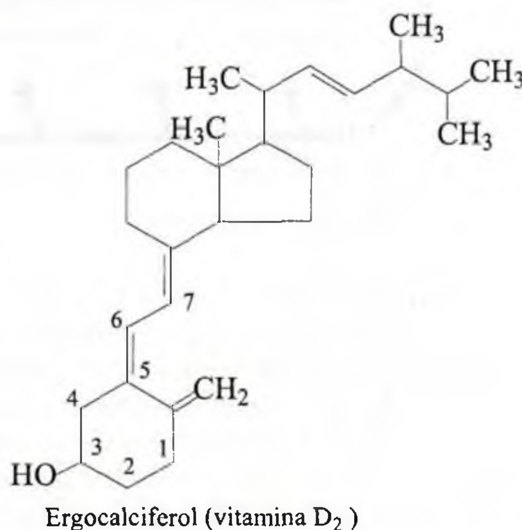
Vitamina D (antirahitică).

Necesitățile umane sunt asigurate de provitaminele din stratul bazal al pielii din precursorul neactiv 7-dihidrocolesterol, printr-o serie de reacții declanșate cu ajutorul razelor UV, formînd, ca rezultat, *vitamina D_3–colecalciferolul.*

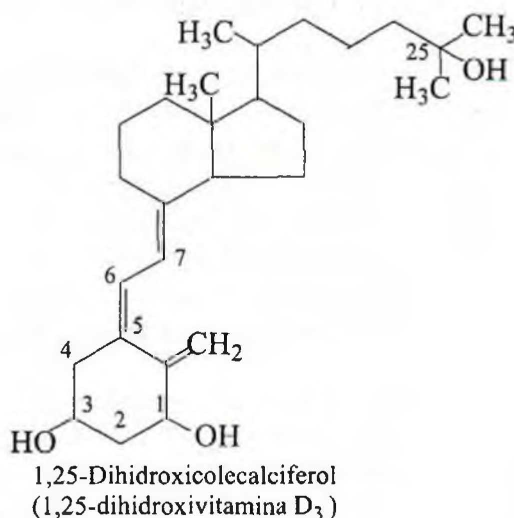
Cantități impunătoare de vitamina D se conțin în ficatul peștilor, deși problema genezei nu e soluționată definitiv. În ficatul peștilor vitamina D se depozitează după transformarea ei din provitaminele planctonului, deși ultimul, situat la supra-



Colecalciferol (vitamina D_3)



Ergocalciferol (vitamina D_2)



1,25-Dihidroxicolecalciferol
(1,25-dihidroxivitamina D_3)

fața apei și utilizat de către pești ca hrană, nu conține vitamina D.

O altă formă răspîndită este *vitamina D_2– ergocalciferolul,* care se prepară în cantități industriale din ergocalciferolul drojdiei de bere prelucrat cu raze UV. Atîta timp cît omul beneficiază firesc de acțiunea razelor solare, el nu are nevoie de adaosuri de vitamina D.

Se vehiculează conceptul precum că strămoșii noștri provin din regiunile tropicale și erau negroizi. O dată cu deplasarea lor spre Nord, culoarea neagră a pielii, ce protejează organismul de razele UV, devine defavorabilă sintezei de vitamina D. În urma selecției genetice, pielea albă a băștinașilor nordului facilitează absorbția razelor UV. La eschimoși, însă, n-a avut loc o selecție similară, deoarece ei asimilează vitamina D din peștele consumat.

Majoritatea de manifestări ale carenței de vit.D, dar posibil și a tuturor, sunt procesele de osificare. Conținutul majorat de calciu din rația alimentară îl reprezintă calciul fosfat. Ca^{++} se absoarbe preponderent în intestinul proximal, în porțiunea distală procesul diminuează. Maturii absorb mai puțin de 1/2 din cantitatea calciului alimentar. Cota se mărește în timpul gravidității și a lactației, la copii – în procesul creșterii fiziologice.

Procesul de absorbție al calciului este inhibat de acizii grași și *acidul fitinic* (ester al acidului fosforic și inozitei), ce se conțin în graminee, formînd săruri de calciu insolubile. În mucoasa ileonului s-a depistat o activitate minoră a *fitazei*, ce catalizează hidrolitic fitatul. La inflamația ileonului, calciul se elimină prin masele fecale. Absorbția se reduce la insuficiența vitaminei D. Studiile efectuate au relevat că vitamina D amplifică absorbția, nu imediat, ci peste cîteva ore, determinată fiind de generarea formei active a vitaminei. Utilizînd colecalciferolul marcat, s-a stabilit natura acestor modificări și organele unde au loc aceste procese (fig.7.35).

Transportul activ al Ca^{++} la nivelul "bordurii în perie" al intestinului implică sinteza unor proteine transportatoare de calciu, stimulată de hormonii steroizi. Transportul are loc împotriva gradientului de concentrație, este cuplat cu al ionilor de Na^{+} și e energodependent.

Colecalciferolul (D_3) este transportat în ficat, unde se modifică în 25-oxicolecalciferol sub acțiunea unui sistem fermentativ mitocondrial, ce funcționează în dependență de NADH și O_2 molecular. Transformările sunt reglate de produsul final și, ca rezultat, se utilizează mai puțină vitamină și, simultan, concentrația nu atinge valori toxice. În continuare, 25-oxicolecalciferol, la rîndul său, este hidroxilat în rinichi, cu formarea 1,25-dioxicolecalciferol. Această fază poate fi blocată prin intermediul *actinomicinei D*, ce presupune că 25-oxicalciferolul induce formarea unui factor (enzimă) necesar pentru transformare. 1,25-dioxicolicalciferol amplifică transportul Ca^{++} în intestine, favorizînd transformarea proteinei celulare din mucoasa intestinală în proteina fixatoare de calciu, ce funcționează la suprafață "în perie". Probabil, această proteină în ansamblu cu ATP-aza Ca^{++}-dependentă ia parte la transportul calciului. Vitamina D activă participă și la mobilizarea Ca^{++} din oase.

S-a demonstrat pe cale experimentală că vitamina D intervine în metabolismul citratului.

Activarea *citrat sintazei*, în corelare cu fosforilarea oxidativă, este implicată în osificare, participă la convertirea fosforului organic în cel anorganic, excluzîndu-l din țesu-

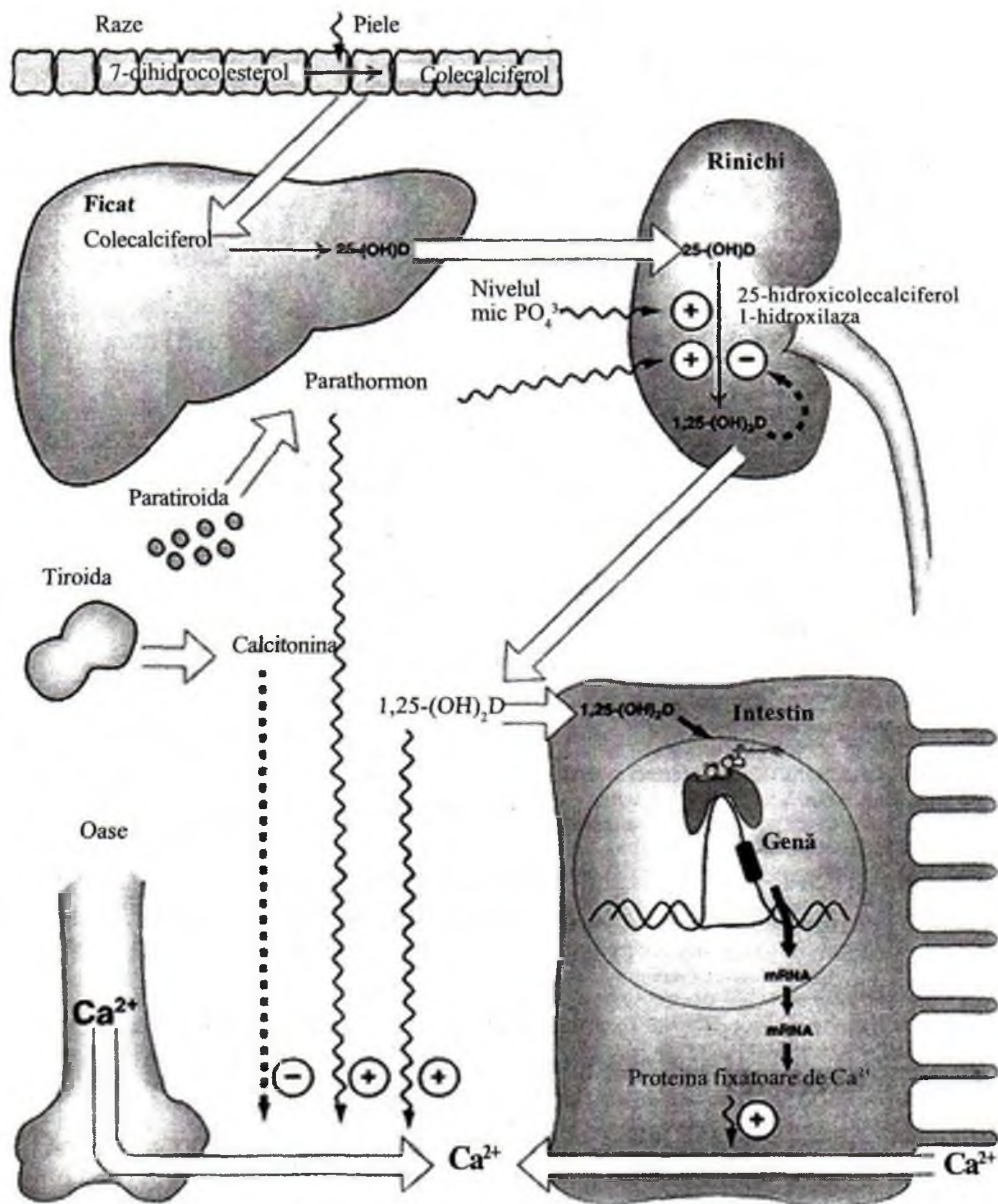


Figura 7.35. ***Metabolismul şi acţiunea vitaminei D***

turi. La reglarea proceselor implicate în economia fosfaţilor, vitamina D manifestă efecte bimodale la concentraţii fiziologice şi în doze terapeutice, sporeşte resorbţia din tubii renali şi reduce excreţia lor. În carenţă şi hipervitaminoză D, reabsorbţia este scăzută şi apare fosfaturia.

Vitamina D activă stimulează activitatea *fosfatazelor alcaline* din oase, hidrolizînd esterii fosforici ai glucidelor proveniţi din sînge şi aprovizionează matricea osoasă cu ioni fosfaţi. De aceea, activitatea majorată a fosfatazelor alcaline indică intensificarea metabolismului osos atît în osificare, cît şi în demineralizarea osului, indiferent de etiologie.

În literatura de specialitate este descris un tip special de rahitism, cauzat de afectarea mecanismelor hepatice şi renale de activare a vitaminei D – rahitism, *vitamina D-rezistent*, ceea ce dictează necesitatea imperioasă a vitaminei D activată.

O dovadă convingătoare este funcţionarea rinichiului artificial în care se înregistrează micşorarea vădită a absorbţiei Ca^{++}, pe cînd administrarea în doze 2,5-5,0 mg/24 ore readuce absorbţia la normal. Datorită particularităţii sale, vitamina D poate fi considerată mesager hormonal.

Nou-născuţii, practic, nu au rezerve de vitamina D şi deci necesită cu siguranţă fie un aport de această vitamină, fie de raze UV. Mamiferele nu sunt apte să depoziteze vitamina D în cantităţi mari, însă numai o singură administrare poate asigura necesităţile organismului pentru cîteva luni.

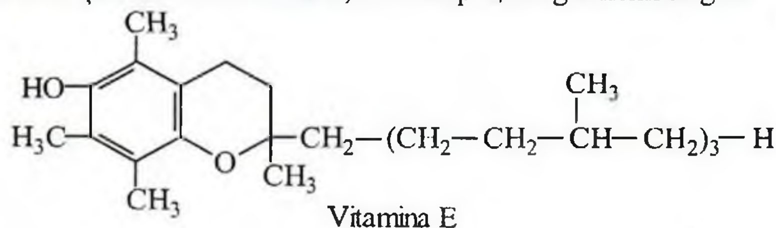
Soarta vitaminei administrate şi a rezultatelor metabolizării ei nu e clarificată pe deplin. O parte din metaboliţi sunt excretaţi cu bila, alta – cu urina şi fecalele.

Consumul exagerat, în perioade lungi, poate cauza atît la copii, cît şi la maturi *hipervitaminoza D*, cu blocarea secreţiei hormonilor paratiroidieni şi nefrocalcinoza, poate provoca formarea calculilor în căile urinare, atrofia testiculelor, hidronefroza etc. Are loc decalcifierea oaselor şi hipercalcemia, cu calcifierile metastatice ale vaselor sanguine, ţesuturilor moi, corneei. Consumul abuziv de preparate cu vitamina D (untură de peşte) pot produce fenomene toxice: anorexie, vărsături, diaree, astenie, mialgii, poliurie, somnolenţă, astenie intensă etc.

La interacţiunea cu alte vitamine, se constată un sinergism la concentraţii optime de vitamina A; la doze mari, vitamina A antagonizează vitamina D, producînd demineralizări şi friabilitatea oaselor, iar în cazul hipervitaminozei D conferă efecte de normalizare. Vitamina D accelerează apariţia scorbutului. Ca antivitamine pot servi compuşii cu structură steroidă din unele plante, cît şi cortizonul, care posedă o structură aproape identică cu provitaminele D.

Vitamina E (tocoferolul, vitamina antisterilică).

Vitamina E constituie o grupă de substanţe compusă din cel puţin trei reprezentanţi – α, β şi γ tocoferoli, unde cel mai activ este derivatul cu trei grupe metil – α-tocoferol. Se obţine din surse naturale, de exemplu, din germenii de grîu.



Vitamina E

Termenul "tocoferol" (din grecescul "*tocos*"– sarcină şi "*phero*"– a purta) elucidează rolul vitaminei la procreare, gestaţie la femei, formarea spermatozoizilor (*vitamina antisterilică*) la bărbaţi. Vitamina E se absoarbe din alimente la nivelul intestinului subţire în condiţiile integrităţii mecanismelor implicate în resorbţia lipidelor şi vitaminelor liposolubile.

Concentrații enorme de vitamină se găsesc în lipidele din testicul și uter, în țesutul adipos. Datorită capacității mari de a fixa O_2, tocoferolii manifestă efecte antioxidative, de protejare a diferitor compuși față de leziunile produse prin oxidare. Această vitamină reține procesul de rîncezire și distrucție oxidativă a vitaminei A în lipidele naturale. Imediat după începutul procesului, însă, produsele oxidării acizilor grași nesaturați distrug vitamina E. Manifestările carenței de vitamina E sunt dependente, posibil, de stoparea efectului de protejare asupra autooxidării acizilor grași nesaturați. Majoritatea compușilor care au o structură asemănătoare cu a tocoferolului (chinonele, ubichinonele) posedă și o acțiune similară cu cea a vitaminei E (unii nu mai puțin activi decît α-tocoferolul).

Efectul antioxidativ al tocoferolilor poate fi prelungit prin adăugarea unor anti-oxidanți sinergici: acid ascorbic, acid citric, care, ca sursă de H, contribuie la regenerarea antioxidantului de bază (α-tocoferolul). *In vivo* aceste substanțe au proprietatea de a proteja animalele de unele manifestări ale carenței de vitamina E.

Se consideră că tocoferolii sunt implicați în sistemul enzimelor respiratorii (NADH-citocrom C reductaza), favorizînd cuplarea fosforilării oxidative. În lipsa lor, se amplifică oxidarea mitocondrială, fără generare de energie.

Țesuturile animale cu carență de vitamina E, în special mușchii miocardului și scheletali, utilizează oxigen cu o viteză mai mare față de țesuturile normale. Fenomenul este determinat de oxidarea peroxidică a acizilor grași polienici. Vitamina E e indicată în metabolismul și fosforilarea creatinei. La insuficiența vitaminei E, au loc dereglări însoțite de creșterea creatinuriei. Acest indicator biochimic este un semn precoce distinctiv al carenței vitaminice, antecedent al manifestărilor clinice.

În reticulul endoplasmatic al celulelor țesutului muscular se elimină hidrolazele lizozomale, ce generează distrofia musculară. În ficat, se deregleză structura mitocondriilor, cu afectarea respirației. Se înregistrează și leziuni ale țesutului conjunctiv și substanței fundamentale, o dată cu creșterea permeabilității vaselor sanguine. Astfel, vitamina potențial poate servi la profilaxia bolilor cardiovasculare. Vitamina E este implicată în reacțiile de acetilare (sinteza acetilcholinei).

Manifestările clinice ale carenței vitaminei E se amplifică, dacă rația alimentară a șobolanilor și a animalelor erbivore (iepurele, cobaiul) va conține cantități însemnate de lipide nesaturate.

Un tablou clinic asemănător se profilează și la *afecțiunea mușchilor albi ai vițeilor*, mieilor: apare, simultan, o paralizie progresivă a membrelor posterioare, cu simptomele respective. La fel, sunt evidente și fenomenele de insuficiență a vitaminei A, iar la om și maimuțe se constată și o *anemie hemolitică,* cauzată de influența peroxizilor. Se consideră că sub acțiunea oxidantă a hemoglobinei, acizii grași polienici din stroma lipoproteică a hematiilor se transformă în peroxizi, micșorînd astfel rezistența eritrocitelor. Rezistența hematiilor la hemoliză e dependentă și de activitatea catalazei, de altfel, și a enzimelor implicate în sinteza hemoglobinei.

Cazurile unice ce confirmă necesitățile de vitamina E pentru om sunt manifestările determinate de dereglările absorbției lipidelor. Necesitățile în această vitamină sunt corelate cu prezența acizilor grași nesaturați în alimente.

În organism, se oxidează atît inelul aromatic, cît şi lanţul izoprenic: are loc conjugarea ambelor grupe hidroxil cu 2 molecule ale acidului glucuronic, formînd diglucoziluronatul.

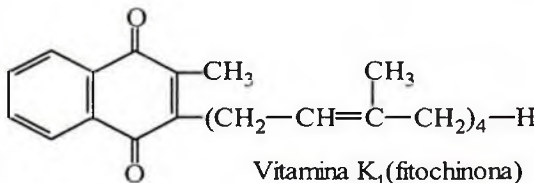
Administrarea unor cantităţi excesive de vitamina A reduce rezervele de vit. E din ţesuturi şi provoacă hipovitaminoza E. Din contra, vitamina E manifestă efecte de protejare a vitaminei A atît *in vitro*, cît şi în organism.

Cantităţile exagerate de tocoferoli scad rapid nivelul vit.B în ficat; consumul sau administrarea terapeutică abuzivă a vitaminei E provoacă tulburări ale ciclului, involuţia ovarelor, afecţiuni nervoase ale membrelor inferioare, fenomene toxice de acumulare (azoospermia).

Vitamina C manifestă acţiune protectoare vizavi de apariţia simptomelor carenţei vitaminei E, iar ultima are un efect de cruţare a vit.C. Regenerarea hemoglobinei în anemie atinge cote maxime la administrarea simultană a vitaminelor E, C şi F.

Vitamina K (antihemoragica).

Se disting două forme de bază – K_1 (*fitochinona*) şi K_2 (*fariochinona*) – ce reprezintă, după structură, un nucleu de bază comun (*naftochinona*) şi diferite lanţuri laterale la poziţia 3. Se consideră că gruparea $-CH_3$ din poziţia 2 este indispensabilă activităţii. Eliminarea sau înlocuirea ei cu alte resturi anihilează acţiunea. Însuşiri similare posedă compuşii analogi după structură.



Vitamina K_1 (fitochinona)

Vitamina K_1 este răspîndită în plantele verzi, la care frunzele expuse luminii sunt mai abundente, decît cele din umbră, iar florile şi fructele aproape nu conţin vitamina K_1. Sursa perfectă a vitaminei K_2 sunt microorganismele. Flora intestinală, spre exemplu, produce cantităţi apreciabile de vitamină K, suficiente pentru a asigura necesităţile organismului uman. Absorbţia vitaminei are loc în jejun, apoi ea este transferată împreună cu lipidele spre vasele limfatice, în sînge şi depozitată în ficat.

Vitamina K este obligatorie pentru sinteza normală a proteinei plasmatice – *protrombina,* un precursor neactiv al trombinei. Activarea protrombinei şi transformarea ei în trombină are loc după fixarea ionilor de Ca^{++}. Într-o moleculă normală de protrombină se conţin cîteva resturi de acid γ-carboxiglutamic, care leagă ionii de Ca^{++}. La carenţa de vit.K, în molecula protrombinei se acumulează resturile acidului glutamic.

Concepţiile contemporane optează pentru participarea vit.K la biosinteza protrombinei la etapa posttranslaţională, sub influenţa unui sistem fermentativ cantonat în membrana reticulului endoplasmatic dependent de vitamina K (NADH reductază). În prezenţa CO_2 si O_2 are loc carboxilarea selectivă a unor resturi de acid glutamic din preprotrombină, cu formarea acidului γ-carboxiglutamic (fig.7.36). Este frecventă ideea că şi alte proteine ce fixează Ca^{++} conţin resturi de acid γ-carboxiglutamic. Se consideră că vit.K participă la sintetizarea a minimum 4 proteine în ficat: *proconvertina*, *factorii Christmas*, *Stuart* şi a *protrombinei*. Se susţine că vit.K participă la procesele de fosforilare oxidativă din ţesuturile animale.

În steatoree cauzată de obturarea căilor biliare, afectarea pancreasului sau altor or-

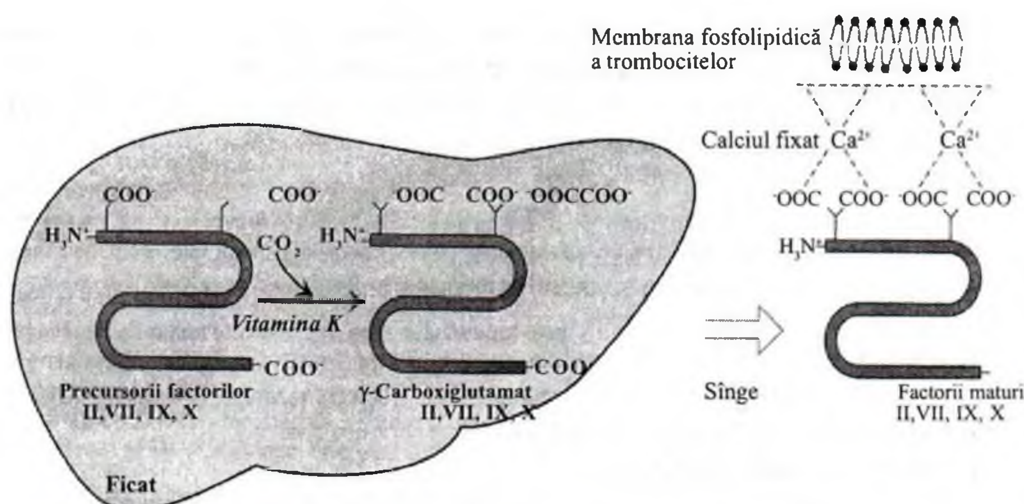


Figura 7.36. ***Rolul vitaminei K în coagularea sîngelui***

gane interne, se îngreuiază absorbția lipidelor, ceea ce duce la carența vitaminei K, soldată cu hemoragii. Insuficiența vitaminei K se observă la nou-născuți și se manifestă sub forma *sindromului hemoragic infantil*, care persistă în dependență de prezența florei bacteriene, capabile să producă vit.K. Deoarece capacitatea de depozitare a vitaminei K este mică, iar metabolizarea ei este foarte rapidă, simptomele caracteristice carenței apar după 28-48 ore. Administrarea vitaminei K gravidelor micșorează pericolul sindromului hemoragic la nou-nascuți. În medicina practică se utilizează și formele solubile în apă – *vicasolul*. În natură, există și antagoniștii vit.K – *dicumarolul,* acidul salicilic ce inhibă în ficat biosinteza factorilor de coagulare proteici și se utilizează în tratamentul bolilor cu o coagulabilitate mărită.

Vitaminele K naturale, practic, nu sunt toxice, cu excepția eventualei hipercoagulabilități, pe cînd cele sintetice provoacă anemie, vărsături, cianoză, convulsii, deprimarea respirației.

Ubichinona (coenzima Q).

E cea mai răspîndită chinonă în toate celulele vii. Se localizează preponderent în membranele mitocondriale și conține 6-10 resturi de izopren ă. Coenzimă liposolubilă cu rol de transportator al hidrogenului în membrana hidrofobă mitocondrială, de altfel e component obligatoriu al lanțului respirator, ce transferă electronii și protonii de la dehidrogenazele mitocondriale la citocromi.

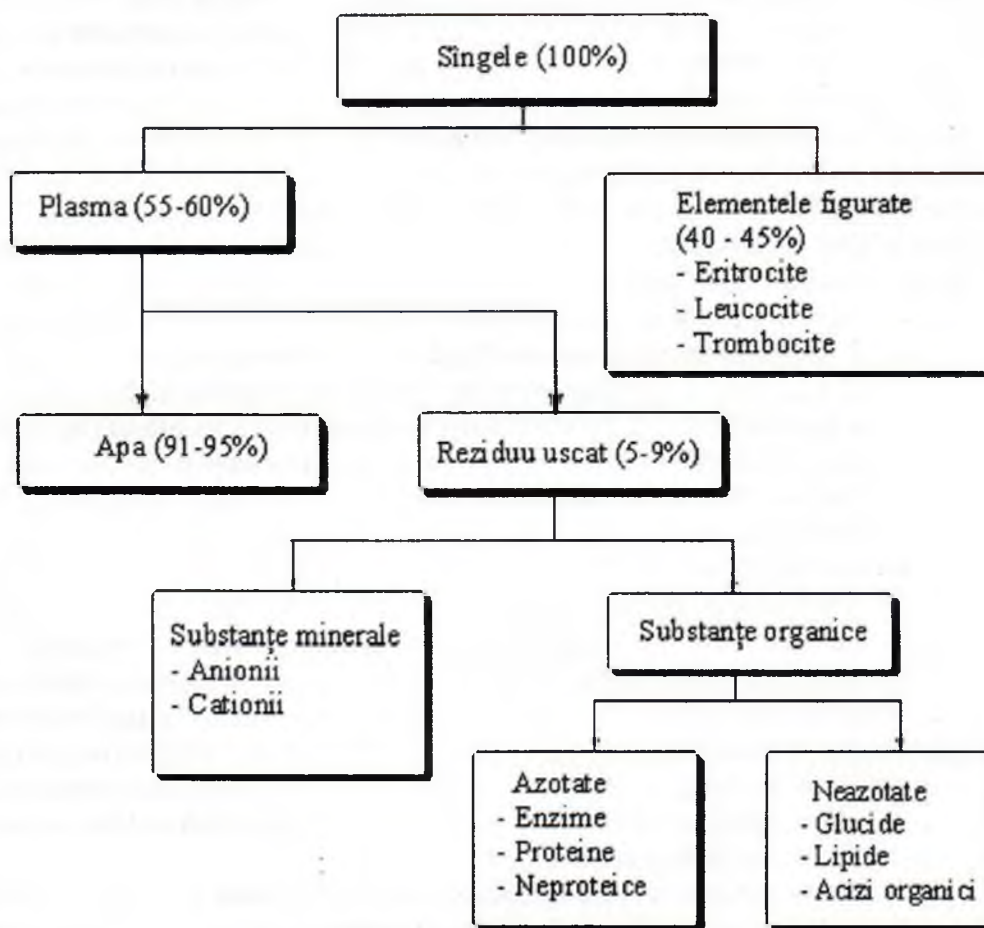
Vitamina F (acizii grași esențiali).

E un component al lipidelor structurale membranare, al particulelor subcelulare cu multiple implicații metabolice, participînd la reglarea efectului hormonal. Vitamina F amplifică acțiunea lipotropă a cholinei și favorizează eliminarea colesterolului din organism. Ea contribuie la transformările stărilor insolubile în solubile, micșorează concentrația lipidelor plasmatice. Vitamina F servește ca precursor la sinteza prostaglandinelor, amplifică efectul biologic al vitaminelor hidrosolubile. Cantități considerabile de acizi grași esențiali se conțin în uleiurile vegetale, mai ales în uleiul de porumb. Ei se utilizează cu succes ca componente chimice, în cosmetologie.

CAPITOLUL VIII. BIOCHIMIA SÎNGELUI ŞI A UNOR ŢESUTURI

Sîngele

Sîngele este unicul ţesut lichid din organismul uman care se compune din faza lichidă – plasmă, şi faza solidă – elemente figurate. Plasma prezintă o soluţie apoasă de compuşi minerali şi proteide. Elementele figurate includ eritrocitele, leucocitele şi trombocitele (schema 8.1).



Schema 8.1 Repartiţia componentelor sanguine

Sîngele circulă continuu prin sistemul vascular, forţa motrice a mişcării fiind pompa cardiacă. El asigură conexiunea umorală a ţesuturilor şi organelor.

Compoziţia sîngelui reflectă metabolismul ţesuturilor şi organelor şi, astfel, constituie substratul optim pentru efectuarea investigaţiilor de laborator.

***Funcțiile*.** În esență, funcțiile sîngelui pot fi rezumate la funcția de transport și cea de reglare homeostatică. Sîngele periferic asigură conexiunea dintre țesuturi și organe, ce se realizează prin racordarea proceselor metabolice, schimbul de substanțe și informație. Efectuînd transportul diverșilor compuși, sîngele menține homeostazia organismului. Sîngele vehiculează oxigenul indispensabil oxidării biologice și CO_2 rezultat din oxidări: substanțele nutritive și produșii finali ai catabolismului, compușii ce intervin în reacțiile specifice și nespecifice de apărare. Astfel, funcțiile de transport au trei aspecte principale: respirator, nutritiv și de apărare.

Reglarea homeostaziei presupune menținerea echilibrelor fizico-chimice ale mediului intern (izoionia, izotonia, izotermia și echilibrul acido-bazic) și celui fluido-coagulant sanguin. Izoionia reprezintă menținerea constantă a concentrațiilor și raporturilor ionilor (Na^+, K^+, Ca^{2+}, Mg^{2+}, Mn^{2+}, Cl^-, HCO_3^-, $H_2PO_4^-$ etc.); izotonia – a presiunii osmotice a sîngelui, ce este în 85% dependentă de Na^+, Cl^-, HCO_3^-; izotermia – a temperaturii corpului. pH normal sanguin este de 7,35 -7,45 și reflectă echilibrul acido-bazic, menținut de sistemele tampon în complex cu organele de eliminare (pulmonii, rinichii, ficatul etc.). Sistemele coagulant, anticoagulant și fibrinolitic reglează fluiditatea sanguină.

Proprietățile fizico-chimice. *Volumul sanguin.* Cantitatea totală a sîngelui din organism ce ocupă întegral aparatul cardiovascular (capilare, artere, vene, cavitățile cardiace) constituie *volumul sanguin total.* El constituie 5-7,5% din masa corpului sau 65-76,7 mL/kg/corp. La un adult cu greutatea de 70 kg volumul sanguin total este de 4,5-5,0 L, din care 2/3 circulă prin patul vascular, iar 1/3 este depozitat în splină, ficat și alte organe. Sîngele depozitat este o rezervă dinamică, ce poate fi mobilizată în caz de necesitate. În condiții fiziologice, la rezerve se apelează pentru acoperirea necesităților crescute în O_2 (efort fizic semnificativ, graviditate etc). Rezerva este solicitată în caz de hemoragii masive și alte condiții patologice.

Sîngele este constituit din două faze. Faza solidă – elementele figurate reprezintă 3% din masa corpului și cca 40-45% din volumul total al sîngelui; la bărbați variind între 42-52%, iar la femei între 37-47%. Faza lichidă – plasma – reprezintă aproximativ 4,5% din masa corporală și 55-60% din volumul total savguin. Raportul procentual valoric al acestor două componente e numit *hematocrit.* El crește în deshidratări, policitemii și scade în anemii. Volumul plasmatic scade (*hipovolemie*) în sindromul nefrotic, șocul traumatic și posthemoragic, arsuri extinse, deshidratări profunde (diaree, vome) etc. Creșteri ale volemiei plasmatice (*hipervolemie*) se atestă în retenții hidrosaline, inclusiv în graviditate; șoc posttransfuzional etc.

Vîscozitatea. Sîngele este un lichid vîscos, vîscozitatea lui totală fiind de 4-6 poises la 38°C. Ea cuprinde vîscozitatea hematiilor, determinată de eritrocite și plasma dependentă de proteinele respective, cu masa moleculară mare (globuline, fibrinogen). Vîscozitatea plasmei este de 1,6-2,1 poises la 38°C.

Vîscozitatea este puțin influențabilă de aportul alimentar de lichide. *Vîscozitatea totală a sîngelui* crește în policitemii și leucemii, datorită creșterii numărului elementelor figurate, iar în sferocitoză și anemia falciformă – grație sporirii rezistenței eritrocitelor. *Vîscozitatea plasmei* se majorează în hiperproteinemii, în special în hipergamaglobulinemii, și este scăzută în diverse forme de anemii.

Valori semnificativ mari ale vîscozității sanguine se înregistrează la nou-născuți, care scad treptat în primul an al vieții pînă la valorile caracteristice adultului. Deosebirea este condiționată de numărul mai mare de eritrocite în sîngele nou-născuților și al copiilor în primul an de viața (cca 6 mln).

Presiunea coloid-osmotică. Presiunea coloid-osmotică este cauzată de proteinele plasmei, ce reprezintă substanțe macromoleculare coloidale. 80% din presiunea coloid-osmotică este determinată de albumine și doar 20% de globuline. Fibrinogenul nu influențează această presiune. Valoarea normală este de 21-35 mm Hg datorită căreia este menținută faza lichidă a sîngelui în patul vascular. Ea scade în cazul hipoalbuminemiilor renale sau hepatice și, în consecință, lichidul părăsește patul vascular, condiționînd apariția edemelor.

Presiunea osmotică. Sîngele are o presiune osmotică (P_O) de 4,92-5,11 mm Hg (7,5-8,1 atm la 37^0) și un punct crioscopic între –0,55^{0}C și –0,60^{0}C. Mai frecvent P_O este exprimată în miliosmoli (mosm). Osmolul este presiunea osmotică dezvoltată de un mol dizolvat într-un litru de apă (22,4 atm la 0^{0}C). Miliosmolii reprezintă raportul concentrației în mg/L la masa atomică a elementului (de exemplu, 23 pentru Na) sau a compusului respectiv (de exemplu, 61 pentru HCO_3^- sau 63 pentru uree).

Plasma sanguină conține 290 mosm, ce sunt repartizați în modul următor:

Cationi (mosm/L)		Anioni (mosm/L)	
Na^+	141,0	Cl^-	104,0
K^+	4,5	HCO_3^-	27,0
Ca^{2+}	2,5	PO_4^{3-}	1,0
Mg^{2+}	1,5	Proteine	2,0
		Acizi organici	6,5
149,5 mosm/L		150,5 mosm/L	

Presiunea osmotică a sîngelui este dependentă de numărul particulelor. Dat fiind faptul că elementele figurate nu influențează presiunea osmotică, cea a sîngelui este practic egală cu a plasmei. Ionii Na^+, HCO_3^- și Cl^- intervin în proporție de 85% în determinarea presiunii osmotice totale. Compușii organici, nedisociabili (ureea, glucoza etc.) au o contribuție relativ redusă în raport cu componenții ionizabili, la realizarea presiunii osmotice a plasmei . Această presiune osmotică acționează asupra fiecărei celule din plasma sanguină. Ea este echilibrată cu o presiune egală din interiorul celulei, ce previne deformarea ei. Dacă acest echilibru este perturbat prin modificări ale presiunii osmotice sanguine, are loc o alterare a structurii și funcțiilor celulare. Micșorarea presiunii osmotice sanguine duce la pătrunderea apei în interiorul eritrocitului și tumefierea acestuia pînă la hemoliză. Orice creștere a presiunii osmotice plasmatice duce la ieșirea apei din celulă și ratatinarea celulei. Izotonia sanguină apare astfel ca o reacție de apărare a organismului pentru menținerea funcțiilor celulare.

Densitatea sîngelui. Densitatea sîngelui total este cuprinsă între 1,050 și 1,060 la 15^{0}C. Ea este mai mare la nou-născuți și variază în limite mai mari. Densitatea eritrocitelor constituie 1,080-1,093, iar a plasmei – 1,024 -1,029.

pH-ul sîngelui. pH-ul sîngelui este în medie cuprins între valorile de 7,35-7,40. Sîngele venos este puțin mai acid – 7,35-7,45, deoarece vehiculează acizii proveniți din procesele metabolice (lactic, acetoacetic, ß-hidroxi-butiric) şi respirația tisulară (H_2CO_3). pH-ul sîngelui arterial este relativ mai alcalin – 7,38-7,46. Mici variații ale pH-ului se atestă în dependență de vîrstă. La copii pH-ul este 7,36-7,45 (la nou-născuți – pH= 7,27), pe cînd la vîrstnici devine mai acid. Limitele pH-ului compatibile cu viața sunt între 7,8 şi 6,8.

Proteinele plasmatice. Prezintă un amestec heterogen de componente proteice cu funcții şi proprietăți diferite. Greutățile moleculare variază între 60-130 kDa. Unele dintre ele sunt holoproteine, altele sunt complexe cu glucide, lipide, metale. Într-un volum de sînge de 5,0 L şi un hematorit de 40%, cei 3,0 L de plasmă conțin 180-240g de proteine, corespunzînd la 60-80g per litru.

Proteinele plasmatice permanent se reînnoiesc şi prezintă o serie de particularități referitor la metabolismul lor. Ele se află în schimb metabolic continuu cu proteinele tisulare. Sunt sintetizate preponderent în ficat şi în țesutul macrofagal, şi procesul este supus unei reglări riguroase.

Funcțiile. Sunt multiple şi constau în următoarele:

- menţin volumul şi presiunea coloid-osmotică a sîngelui, de altfel şi schimburile dintre capilare şi țesuturi. Preponderent, sunt răspunzătoare de această funcție albuminele;
- transportă vitamine, metale, hormoni, pigmenți, lipide, medicamente;
- participă la menținerea echilibrului acido-bazic al sîngelui;
- participă la sistemul de apărare nespecifică şi specifică a organismului prin: properdină, lizozim, complement, proteina C reactivă, transferină, imunoglobuline;
- menţin echilibrul fluido-coagulant;
- determină microcirculația şi vîscozitatea;
- reprezintă o rezervă proteică importantă în situații deficitare de aport proteic alimentar.

Principalele proteine. Imunoglobulinele şi proteinele coagulării vor fi redate în capitolele respective. O importanță biologică deosebită au proteinele reglatoare – citokinele, mediatori endogeni care asigură o comunicarea între celule (interleukinele, interferonii, factorul de necroză tumorală – TNFα).

În continuare, vom prezenta proteinele plasmatice de importanță clinică.

Albumina. Este o proteină majoră, reprezentînd 55-60% din totalul proteic plasmatic cu un nivel de 35-45 g/L. Are o greutate moleculară de 69 kDa şi un T1/2 egală cu 17-27 zile. Serumalbumina este sintetizată în ficat, are un lanț polipeptidic compus din 580 aminoacizi. Are o construcție spațială deosebită ce-i permite o flexibilitate remarcabilă. Proteina menține presiunea coloid-osmotică a plasmei, intervenind în reglarea schimburilor între plasmă şi lichidul interstițial. Albumina transportă o varietate de componente (acizi graşi, pigmenți biliari, vitamine, hormoni, medicamente, ioni metalici). Simultan, albumina constituie o importantă sursă de aminoacizi esențiali utilizați în procesele de sinteză.

Scăderea presiunii coloid-osmotice prezintă un puternic stimul în sinteza hepatică de albumină. Hormonii glucocorticoizi şi tiroidieni stimulează atît sinteza, cît şi catabolismul proteinei. *Hipoalbuminemia* survine în stările patologice virale, în afecțiuni ale parenchimului hepatic în condițiile unei reduceri semnificative a numărului de hepatocite,

în afecțiuni renale și intestinale, în malnutriție și malabsorbție. Analbuminemia este o maladie genetică transmisă autosomal recesiv, manifestată la homozigoți, cu simptome destul de pronunțate: edeme maleolare, hipotensiune arterială.

Glicoproteinele. Ele conțin proporții variate de glucide (3-30%) – hexoze, hexozamine, acid sialic, legate covalent cu lanțul polipeptidic. Aproximativ 10% din totalul proteinelor plasmatice revin inhibitorilor proteazelor cu rol de protecție. După fixarea inhibitorului de protează, complexul este recunoscut de receptorii celulari specifici, apoi captat și înlăturat din circulație.

Cei mai importați inhibitori de proteaze fac parte din grupa *serpinelor* (serine proteaze inhibitors). Specificitatea lor este relativă: o anumită protează poate fi blocată de mai mulți inhibitori, afinitate determinată de anumite secvențe aminoacidice.

Alfa-1 antitripsina (α_1-AT). Sinteza ei în ficat este stimulată de citokinele macrofagelor. Este o glicoproteină cu greutatea moleculară de 53 kDa și o concentrație în ser de 2-6 g/L. Posedă mai multe forme moleculare. Proteina este inhibitor natural al proteazelor, inhibînd și chimotripsina, kalicreina, plasminele. α_1-AT destul de ușor trece în interstițiu și poate proteja țesuturile de activitatea distructivă a proteazelor. Se consideră că fumatul și radicalul superoxid generat de neutrofile pot inactiva proteina prin oxidarea situsului reactiv. În procesele inflamatorii ale căilor respiratorii se eliberează *elastaza* din neutrofilele focarului inflamator. În mod normal proteaza este inhibată de α_1-AT exudată în țesutul inflamat. În cazurile cu deficit de α_1-AT elastaza va degrada proteolitic septele interalveolare și va duce implicit la apariția unui enfizem panlobular. Administrarea de α_1-AT purificată din plasmă sau obținută prin inginerie genetică poate preveni sau stopa apariția bolii la subiecții cu deficit genetic. Deficitul ereditar (*Laurell-Eriksson*) de α_1-antitripsină se transmite recesiv autosomal.

În această grupă de serpine se includ și: *α_1-antichimotripsina, α_2-antiplasmina, antitrombina III, inhibitorii activării plasminogenului (PAI-1, PAI-2, PAI-3)* ș. a.

Macroglobulina α_2 *(α_2-MG)* sintetizată de ficat, macrofage și endotelii are o greutate moleculară de 735 kDa și o concentrație plasmatică de 200-300 mg/dL. Este un inhibitor cu un spectru larg de activitate, inhibînd enzimele coagulării, plasmina, elastaza, colagenaza, catepsina 6. Proteina nu face parte din clasa serpinelor. α_2-MG posedă și funcția de a lega majoritatea citokinelor, modulînd activitatea lor proinflamatorie. Posedă α_2-MG și efecte imunoreglatoare, intervenind în sinteza imunoglobulinelor. Efectuează și funcția de transport al insulinei, zincului și altor microelemente.

Deficitul este însoțit de sîngerări pasagere determinate de accelerarea fibrinolizei. Creșteri importante se constată în sindromul nefrotic, diabet zaharat, unde nivelurile α_2–MG corelează cu prezența nefro- și retinopatiei.

α_1-glicoproteina acidă (α_1-GA) are o componentă glucidică de 42%. Este sintetizată în ficat și se află în plasmă în concentrație de 44-140 mg/dL. Proteina (*orosomucoid*) nu are specificitate, dar este un indicator important al procesului inflamator, revenind la normal dupa 2 săptămîni de la vindecare.

Componenta glucidică se fixează nespecific la suprafața unor bacterii, virusuri. De asemenea leagă o serie de medicamente – miorelaxantele, psihotropele. I se atribue și un rol de modulare a răspunsului imun, temperînd activarea neutrofilelor. Scăderi ale α_1-

GA s-au semnalat în malnutriţie, ciroza hepatică şi sindromul nefrotic.

α_1*-fetoproteina* se sintetizează în ficat şi tractul intestinal. În hepatom concentraţia plasmatică creşte pînă la 2 mg/L (normal este de 10 ng/mL).

Proteina C reactivă (CPR) alcătuită din cinci subunităţi identice, asociate prin legături necovalente. Se sintetizează preponderent în ficat, unde este indusă de IL-6. În condiţii normale are o concentraţie serică sub 0,5 mg/dL, dar pe parcursul unui proces inflamator poate creşte de sute de ori. Poartă denumirea de la afinitatea mare faţă de polizaharidul C al pneumococului. Poate lega şi alte glicoproteide aflate în peretele numeroaselor bacterii, fungilor. CPR reprezintă un indicator important întru detectarea infecţiilor, inflamaţiilor acute şi cronice. Proteina creşte şi în inflamaţii nespecifice.

Haptoglobinele. Sunt o familie de glicoproteine sintetizate în ficat şi capabile să lege hemoglobina (1 mol leagă 2 moli de Hb). Complexul este captat din circulaţie de către macrofage, prevenind o eventuală pierdere de fier pe calea urinară. Compuse din 4 lanţuri polipeptidice (2α şi 2β), ultimele comune tuturor tipurilor de haptoglobine, au o concentraţie serică de 300 mg/dL. Fenotipurile (10) de haptoglobine sunt folosite în studii de genetică a populaţiei. Haptoglobinele sunt reactanţi de fază acută, crescînd în infecţii microbiene, arsuri, reacţii alergice, leucemii, cancer. Scăderile se evidenţiază în insuficienţă hepatică, anemii hemolitice. T1/2 al haptoglobinelor este de 5 zile, dar sub forma de complex cu hemoglobina acest timp se reduce la 9-30 minute. Se depistează prin imunodifuzie radială.

Ceruloplasmina reprezintă o metalglicoproteină cu o mobilitate α_2-globulinică. Conţine molecula 0,30-0,32% Cu şi are o greutate moleculară de 130-160 kDa. Cei opt atomi de Cu sunt transferaţi către citocromoxidază în decursul sintezei acesteia. Ceruloplasmina e implicată în metabolismul aminelor biogene, intervine în oxidarea Fe^{2+} la Fe^{3+}. Sunt descrise mai multe fenotipuri de această proteină. Creşteri reactive nespecifice s-au depistat în procesele inflamatorii şi maligne (*limfogranulomatoza malignă*). În *boala Wilson* (*degenerescenţa hepatolenticulară*) ficatul şi nucleul lenticular din creier conţin cantităţi anormal de mari de Cu. Se excretă excesiv cu urina, în timp ce plasma conţine o cantitate mică de Cu şi de ceruloplasmină. Se observă şi o absorbţie intensivă de Cu în intestin. Depozitarea excesivă de cupru în ficat duce la ciroză, cu deteriorarea sintezei de ceruloplasmină sau a unui defect de încorporare a Cu în globulină şi, în consecinţă, o cantitate mare de Cu liber se combină anormal cu proteinele din creier şi ficat. Cuprul acumulat provoacă distrugerea celulelor (inelele *Kaiser-Fleischer* pe cornee). Depunerea poate fi redusă, şi sporită eliminarea, prin urină cu ajutorul administrării unor substanţe chelatoare ca D-penicilamina. Poate fi dereglată şi reabsorbţia cuprului în duoden (*boala Menkes-tricopolidistrofia*), patologie legată de cromozomul X. Valoarea normală a ceruloplasminei în plasmă e de 2,0-3,4 µmol/L (0,25-0,45 g/L).

Transferina prezintă o β-glicoproteină formată dintr-un lanţ polipeptidic cu o masă moleculară de 86 kDa. Se cunosc mai multe forme moleculare ale transferinei genetic determinate. Cele mai cunoscute sunt tipurile B, D, C. Transferina poate fixa 2 atomi de Fe/moleculă (în mediul neutru). Sunt sintetizate preponderent în ficat, dar în cantităţi reduse şi în splină, ganglioni limfatici şi celulele epiteliale ale mucoasei intestinale (ileon).

Transferina fixează Fe ionizat de proveniență intestinală sau în organele de depozitare a metalului. În condiții fiziologice numai 1/3 din transferină este saturată cu Fe.

Nivelul *sideremiei* variază între 70-170 γ % pentru bărbați. Capacitatea de fixare a Fe de către transferină (IBC-iron Binding Capacity) corespunde cantității de Fe necesară pentru saturația ei (180-280 μg% pentru bărbați și 150-250 μg% pentru femei sau, respectiv, 32-50 μmol/L și 27-45 μmol/L). Capacitatea totală de fixare a fierului (TIBC) se obține din suma valorii sideremiei și a IBC (300-400 și 250-350 μg% sau 54-72 și 45-63 μmol/L la bărbați și femei). Se mai calculează și *coeficientul de săturație* din raportul sideremiei și a TIBC, egal cu 40% și 35% la bărbați și femei, respectiv (16-45).

Transferina este fixată de receptorii celulari specifici, care preiau Fe. În inflamații, macrofagele activate înglobează cantități majore de Fe cu transferină ce duce la o scădere a lor în ser. În anemiile feriprive, concomitent cu scăderea sideremiei se semnalează creșterea marcantă a transferinei. Valori normale: 50-70 μmol/L (0,3-0,4 g/L).

Imunoglobulinele plasmatice, fiind glicoproteine, sunt sintetizate în plasmocite, reprezentînd aproximativ 20% din totalul proteinelor plasmatice. Mai detaliat sunt redate în biochimia răspunsului imun.

ELEMENTELE FIGURATE – PARTICULARITĂȚILE COMPOZIȚIEI ȘI METABOLISMULUI

Celulele sanguine au fost studiate foarte intens din trei considerente:

a) Realizează funcție extrem de importante pentru întregul organism.

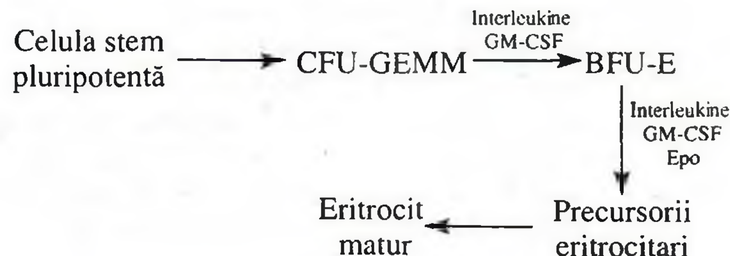
b) Sunt implicate în variate stări patologice și afecțiuni.

c) Pot fi ușor obținute în scopul cercetării și diagnosticului de laborator.

Eritrocitele exercită transportul gazelor și contribuie la menținerea echilibrului acido-bazic; leucocitele asigură protecția de organisme și corpi străini; trombocitele sunt esențiale în procesele hemostazei. Conștientizarea rolului celulelor sanguine pentru sănătate și în afecțiuni necesită cunoașterea proceselor biochimice fundamentale ce le caracterizează.

Particularitățile compoziției chimice și ale metabolismului eritrocitului. Eritrocitele (hematiile) sau globulele roșii sanguine constituie cca 25 mlrd în volumul total de sînge sau 4-6 mln într-un mililitru ($4,0\text{-}6,0 \times 10^{12}$/L). Durata vieții lor este cuprinsă între 110-130 zile, fiind produse cu un debit de 2,4 mln/sec. Eritrocitele mature au forma unui disc biconcav cu diametrul de 7,2-7,9 μm și grosimea de 1,0-2,2 μm.

Mecanismele biochimice ale maturației eritrocitelor. Eritrocitele sunt produse prin eritropoieză medulară din celula-stem. Procesul este reglat de *eritropoietină*. Eritropoietina umană este o glicoproteină formată din 166 resturi de aminoacizi cu masa moleculară de 34 kDa. Ea este produsă preponderent de rinichi, ce o elimină în circuitul sanguin sub influența hipoxiei. În medula osoasă eritropoietina interacționează cu receptorii specifici de pe membrana precursorilor imaturi ai eritrocitelor – BFU-E (burst-forming unit-erythroid) și CFU-E (colony-forming unit-erythroid), stimulînd proliferarea și diferențierea lor. Aceste efecte sunt exercitate doar în complex cu interleukina-3, factorul de creștere insulinic, G-CSF și GM-CSF (granulocyte- and granulocyte-macrophage colony-stimulating factors, respectiv), conform schemei 8.2.

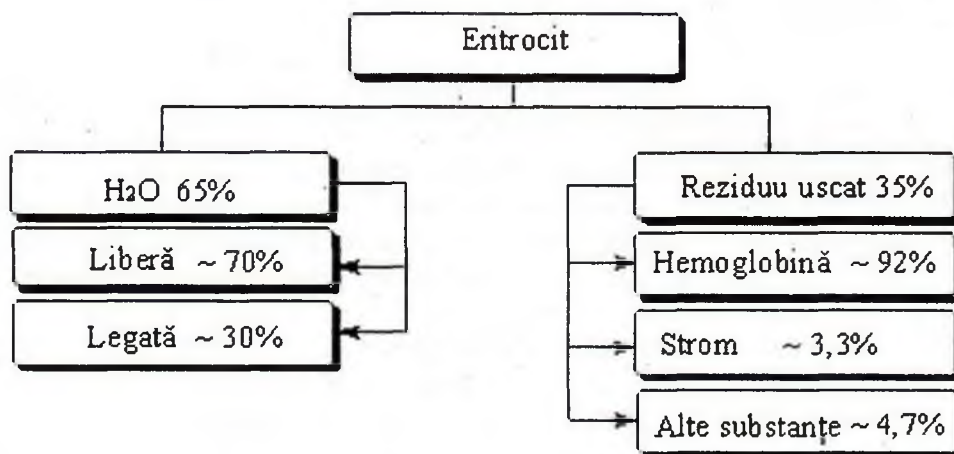


Schema 8.2 ***Precursorii eritrocitari şi mecanismele de reglare (Epo - eritropoietina)***

Precursorii eritrocitelor mature sunt celule nucleate şi metabolic active. În aproximativ 24 ore după intrarea în circuitul sanguin celulele pierd majoritatea structurilor intracelulare (nucleul, ribozomii, mitocondriile etc.) şi numeroase procese metabolice asociate cu ele.

Primar, un inhibitor proteic specific reduce procesele de respiraţie tisulară prin inhibarea succinat dehidrogenazei, NADH-citocrom reductazei şi citocromoxidazei. Paralel, se diminuează activitatea glicolizei, redirecţionată spre calea anaerobă. Procesele respiratorii sunt reduse la 1/50 din valoarea corespunzătoare formelor imature. Cantitatea ATP-ului se înjumătăţeşte, ceea ce diminuează semnificativ procesele biosintetice energodependente. Dispare sinteza proteinelor şi a diferitelor tipuri de RNA.

Compoziţia chimică a eritrocitelor (schema de mai jos)



Compoziţia minerală a eritrocitelor este dependentă de specie. La om ele conţin:

- potasiu (K^+) - 125 mEq/L sau 4,8 g/L
- sodiu (Na^+) - 20 mEq/L sau 0,46 g/L
- calciu (Ca^{2+}) - 1,2 mEq/L sau 0,025 g/L
- clor (Cl^-) - 60 mEq/L sau 1,8-2,4 g/L
- bicarbonat (HCO_3^-) - 15 mEq/L
- fosfaţi anorganici ($H_2PO_4^-$, HPO_4^{2-}) - 1,1 mEq/L sau 0,035 g/L

Cu excepția potasiului, cantitatea celorlalți compuși este mai mică decît nivelul plasmatic. Deosebit de mari sunt diferențele între concentrațiile eritrocitare și plasmatice ale Na^+ / K^+, menținute prin activitatea Na^+ / K^+ -ATPazei.

Substanțele organice sunt reprezentate în majoritate prin hemoglobină, concentrația ei fiziologică constituind în medie 32 pg, cu variații extreme de 27-34 pg (1 pg = 10^{-12} g) per eritrocit, ce corespunde a circa 28 milioane molecule Hb (120-150 g/L).

În eritrocitele adulților predomină cantitativ HbA_2 (α_2 și β_2), HbA_1 ($\alpha_2\delta_2$), constituind cca 2,5 % din concentrația totală, iar HBF ($\alpha_2\gamma_2$) se conține în cantități infime. În eritrocitele senescente apare HbA_3 care este o formă îmbătrînită a hemoglobinei.

Proteinele nehemoglobinice de referință sunt localizate în citozol, stromă sau membrana celulei. Din membrană pot fi separate cca 10 proteine inedite, majoritatea fiind glicoproteine. Principalele proteine integrale membranare sunt AEP (*Anion Exchange Protein*) și *glicoforinele*. AEP străbate membrana de cca 10 ori, formînd un tunel ce asigură schimbul ionilor de clor și bicarbonat. Bioxidul de carbon ce rezultă din procesele oxidative celulare pătrunde în eritrocit în formă de ion carbonat, iar în pulmoni este eliberat în schimbul clorului. Capătul N-terminal al AEP fixează alte proteine, cum ar fi hemoglobina, ankirina, unele enzime glicolitice etc. Glicoforinele (A, B și C) străbat membrana doar o singură dată. *Glicoforina A*, forma majoră, conține 131 resturi de aminoacizi și este extrem de glicozilată. Capătul N-terminal, ce conține 16 catene oligozaharidice, se află pe suprafața externă a membranei și, datorită polimorfismului determină tipul MN al grupelor sanguine. Capătul C-terminal se extinde în citoplasmă și fixează proteina 4.1, atașată la spectrină.

Spectrina (α si β), ankirina, adducina, actina, tropomiozina și celelalte proteine periferice contribuie la menținerea formei și flexibilității eritrocitelor. Ele formează citoscheletul celulei. Principala proteină a citoscheletului este *spectrina*. Ea este formată din două lanțuri polipeptidice – α și β. În catene alternează segmente α-helicoidale și secvențe nespiralate. Lanțurile sunt aranjate antiparalel în dimeri care, la rîndul lor, formează tetrameri. Spectrina posedă catene pentru legarea altor molecule de spectrină, a ankirinei, actinei, proteinei 4.1. *Ankirina* în asociație cu *proteina 4.1* securizează legarea spectrinei la membrana eritrocitară, realizînd o conexiune strînsă între membrană și citoschelet. Conexiunea este fortificată de legăturile proteinei 4.1 cu anumite fosfolipide ale bistratului lipidic membranar (fig.8.1).

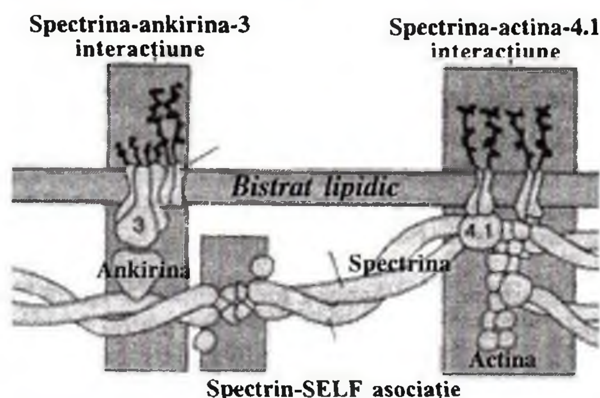


Figura 8.1. ***Interacțiunea proteinelor citoscheletului cu proteinele membranare eritrocitare***

Carențele proteinelor citoscheletului și ale membranei eritrocitare sau dereglările structurii lor sunt cauzele unor afecțiuni ereditare, ca sferocitoza (*spectrina*) și elipsocitoza (proteina 4.1 sau *glicoforina C*).

O clasă aparte de proteine reprezentate masiv în eritrocit sunt proteinele-enzime. O activitate mare au enzimele glicolitice ce asigura buna decurgere a glicolizei – principalul furnizor de energie în formă de ATP. Enzimele ce catalizează reacțiile de fosforilare la nivel de substrat: *1,3-bifosfoglicerat kinaza* şi *piruvat kinaza* sunt deosebit de active. În eritrocit există o deviere de la glicoliză – specifică doar acestui tip de celule. Această ramificare, numită *ciclul Rappoport - Luebering*, produce *2,3-difosfo-gliceratul* ce reglează afinitatea hemoglobinei față de oxigen. Enzima-cheie a ciclului *este 1,3-difosfoglicerat mutaza.*

De asemenea, o activitate mare denota *glucozo-6-fosfat dehidrogenaza*, cît şi enzimele ciclului glutationului (*glutation peroxidaza, glutation-S-transferaza şi glutation reductaza*); enzimele complexului care asigură reducerea la hemoglobină a cantităților insignifiante de methemoglobină ce se formează în condiții normale (*NADH-dehidrogenazele I şi II; NADPH-dehidrogenazele A şi B*); *carboanhidrazele A, B şi C* ce contribuie la transportul CO_2 în formă de carbonați.

Compuşii organici neproteici esențiali diferă prin compoziție şi cantitate atît de plasmă, cît şi de alte celule. În cantități reduse, comparativ cu cele plasmatice, sunt glucoza şi ureea. Colesterolul este reprezentat predominant de forma liberă, pe cînd în plasmă el este preponderent esterificat (2/3). În concentrații relativ mari sunt prezenți compuşii fosforilați – ADP, ATP, NAD, NADP, fosfolipidele, hexozo-fosfații, *2,3-difosfo-gliceratul* etc. *Glutationul* sanguin este esențial redus şi totalmente localizat în eritrocit. Cea mai mare parte a *acidului nicotinic* şi a *nicotinamidei* sanguine este concentrată în eritrocit.

Particularitățile metabolismului eritrocitului

Eritrocitul este o celulă ce consumă puțin oxigen (5 L/h/mL) în raport cu cantitatea lui intracelulară şi consumul altor țesuturi. Oxigenul este utilizat în principal pentru autooxidarea flavoproteinelor, a NADH-ului produs în glicoliza anaerobă, a glutationului prin intermediul methemoglobinei. Consumul redus de oxigen este consecință absenței lanțului respirator şi a majorității enzimelor ciclului Krebs.

Utilizarea glucozei are loc în glicoliza anaerobă (cca 90 %) şi ciclul pentozo-fosfaților (cca 5-10 %), lipsind calea glicogenogenezei. Glicoliza anaerobă eritrocitară se află în echilibru cu calea 2,3-difosfo-gliceratului (figura 8.2).

Activitatea predominantă a unei sau altei căi metabolice este dictată de cantitatea ADP-ului. La valori scăzute ale raportului [ATP] / [ADP] este facilitată calea glicolitică şi inhibată producerea 2,3-difosfo-gliceratului. Astfel, se produce prin fosforilare la nivel de substrat ATP. Cînd concentrația ATP-ului este mare, predomină acumularea 2,3-difosfo-gliceratului.

Glicoliza anarobă este calea majoră de generare a ATP-ului în eritrocit, chiar şi la un randament foarte redus (30%). A doua cale, cu acțiune limitată, este reacția adenilatkinazică.

$$2\,ADP \xrightleftharpoons{\text{Adenilatkinaza}} ATP + AMP$$



Cantitatea de ATP generată sumar este suficientă pentru întreținerea funcției respiratorii a hemoglobinei, a formei discoidale a celulei, a homeostazei ionice etc.

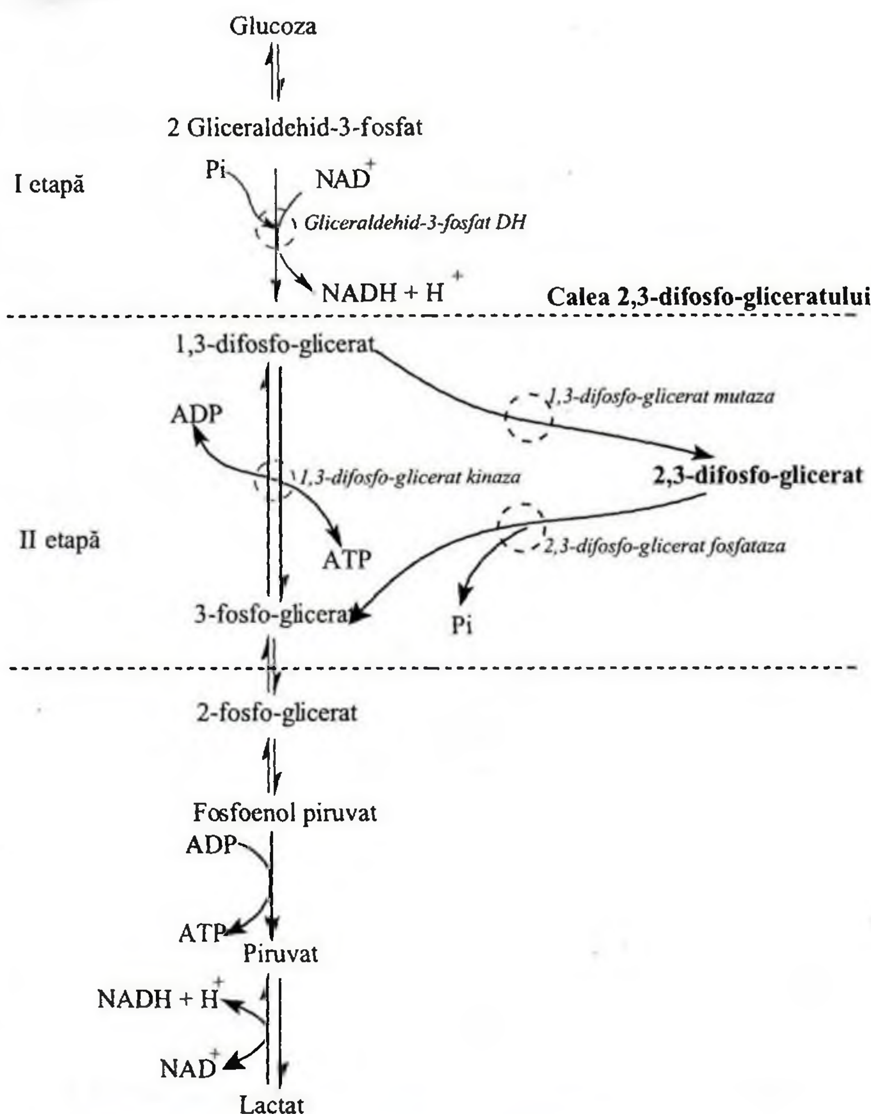
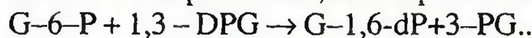


Figura 8.2. Glicoliza anaerobă cu ciclul Rappoport-Luebering

În decursul glicolizei anaerobe, în eritrocit se acumulează, în concentrație sporită, *glucozo-1,6-difosfatul.* Se consideră că producerea și acumularea lui ar fi datorată fosforilării G-6-P pe seama 1,3-DPG printr-o reacție de transfosforilare:



G–6–P + 1,3 – DPG $\rightarrow$ G–1,6-dP+3–PG..

Rolul metabolic al G-1,6-dP este însă neelucidat complet. Ciclul Rappoport-Luebering are menirea de a produce 2,3-difosfo-glicerat. Compusul este un potențial modulator alosteric al afinității hemoglobinei față de oxigen, ce favorizează cedarea lui țesuturilor.

Secundar, 2,3-difosfo-gliceratul:

a) constituie o rezervă energetică utilizată în condițiile reducerii activității glicolitice;
b) contribuie indirect la reducerea methemoglobinei;
c) facilitează energetic exportul K^+ din eritrocit.

Ciclul pentozo-fosfaților consumă cca 5-10% din glucoza eritrocitară cu scopul formării NADPH+H^+ în reacția catalizată de glucozo-6-fosfat dehidrogenază. Rata producerii pentozo-fosfaților în eritrocit este neglijabilă, iar calea în sine nu are semnificație în acest tip de celule. Șuntul pentozo-fosfaților are o intensitate suficientă pentru a menține valoarea optimă a raportului NADPH/$NADP^+$, de care depinde reducerea methemoglobinei și a glutationului.

Contactul hemoglobinei cu oxigenul, în concentrații mari, decurge spontan, neenzimatic oxidat la methemoglobină (Fe^{3+}), incapabil să transporte oxigen. În condiții fiziologice, mai puțin de 3% din hemoglobina eritrocitară este oxidată. Menținerea Hb în stare redusă (Fe^{2+}) este realizată de *methemoglobin reductazele NADH dependente (I și II) și NADPH dependente (A și B)*. Furnizorii NADH-ului și NADPH-ului sunt glicoliza și ciclul pentozo-fosfaților, respectiv (fig.8.3).

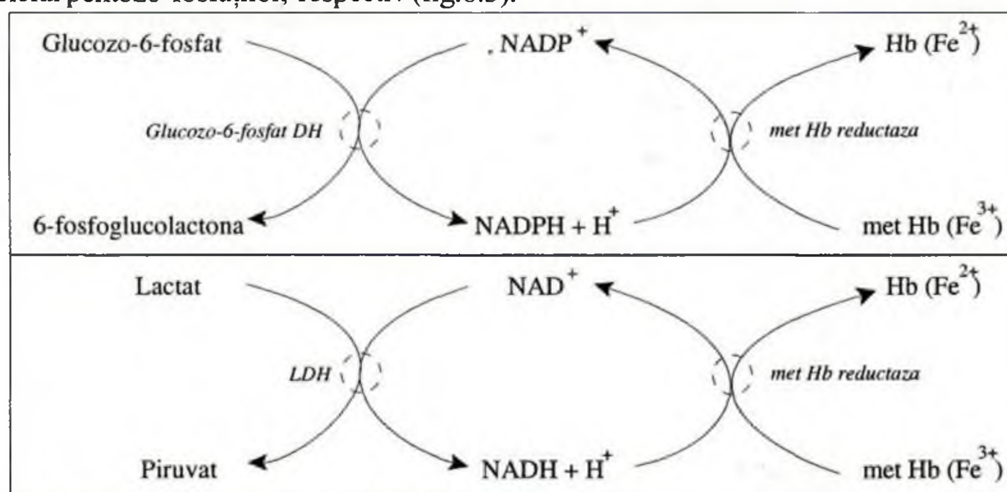
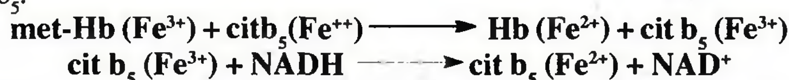


Figura 8.3. ***Reducerea methemoglobinei***

Methemoglobin reductazele NADH-dependente I și II funcționează în complex cu citocromul b_5:



$$\textbf{met-Hb }(Fe^{3+}) + \textbf{citb}_5(Fe^{++}) \longrightarrow \textbf{Hb }(Fe^{2+}) + \textbf{cit b}_5\,(Fe^{3+})$$
$$\textbf{cit b}_5\,(Fe^{3+}) + \textbf{NADH} \longrightarrow \textbf{cit b}_5\,(Fe^{2+}) + \textbf{NAD}^+$$

Autooxidarea Hb la methemoglobină este însoțită de generarea superoxidanion radicalului:



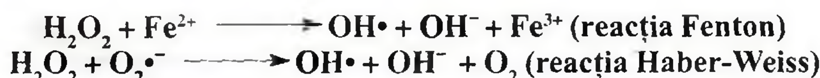
$$\textbf{Hb }(Fe^{2+}) + O_2 \longrightarrow \textbf{met Hb }(Fe^{3+}) + O_2^{\bullet-}$$

Ultimul declanșează producerea altor specii agresive ale oxigenului, ce induc oxidarea peroxidică a lipidelor membranare, inactivarea enzimelor și altor procese nocive în celulă. Protecția antioxidantă a eritrocitului este deosebit de puternică și eficientă. Ea include superoxiddismutaza, catalaza, glutationul și sistemul său enzimatic. *Superoxiddismutaza* (SOD) neutralizează superoxidanion radicalul conform ecuației:



$$2O_2^{\bullet-} + 2H^+ \longrightarrow H_2O_2 + O_2$$

Peroxidul de hidrogen rezultat este, de asemenea, o specie reactogenă a oxigenului, ce poate interacționa cu superoxidanion sau Fe^{2+} pentru a genera cel mai toxic compus – *radicalul hidroxil (OH•)*:



$$H_2O_2 + Fe^{2+} \longrightarrow OH\bullet + OH^- + Fe^{3+} \text{ (reacția Fenton)}$$
$$H_2O_2 + O_2\bullet^- \longrightarrow OH\bullet + OH^- + O_2 \text{ (reacția Haber-Weiss)}$$

Aceste reacții sunt limitate prin intervenția catalazei și a glutation peroxidazei.



$$2H_2O_2 \xrightarrow{Catalaza} 2H_2O + O_2$$

Glutation peroxidaza neutralizează și alți peroxizi, în special, ai acizilor grași polienici din membrana eritrocitară. Enzima necesită glutation redus (GSH), cantitatea căruia este menținută de glutation reductaza (NADPH). Astfel, acționînd în tandem, enzimele mențin raportul optim GSH/GSSG, de care depinde supraviețuirea celulei (fig.8.4).

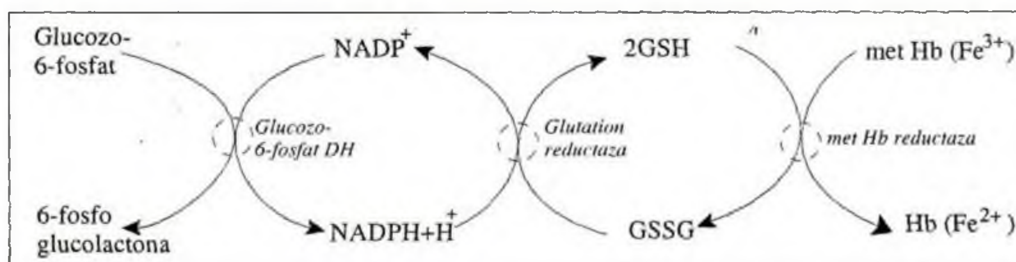


Figura 8.4. ***Șuntul pentozo-fosfat și metabolismul glutationului***

Eritrocitele sunt lipsite de sistemele enzimatice necesare biosintezei acizilor nucleici, proteinelor și acizilor grași. Unele lipide, spre exemplu colesterolul, pot fi acumulate prin schimb din plasma sanguină. Eritrocitele posedă unele enzime ale degradării nucleotidelor (AMP-dezaminaza, pirimidin nucleotidaza), dar procesul catabolic respectiv nu este intens. Generarea conținutului de AMP favorizează refacerea rezervei de ATP.

Afecțiunile majore ale eritrocitului

Cele mai frecvente afecțiuni ale eritrocitelor se manifestă prin anemii (micșorarea nimărului celulelor), apariția unor celule cu forme anomale și rezistență scăzută la acțiunea factorilor hemolizanți. Ele pot fi ereditare sau dobîndite. Tabelul 8.1 însumează aceste afecțiuni.

Particularitățile compoziției și ale metabolismului leucocitelor

Seria mielocitară include leucocite: neutrofile, eozinofile și bazofile; limfocite și monocite. Numărul leucocitelor din sîngele circulant variază între 3,200-9,800/mm^3 (3,2-9,8 x 10^9/L) și în mod normal cota granulocitelor neutrofile este de 56-69%, a eozinofilelor de 1-4% și bazofilelor pînă la 1%. Limfocitele reprezintă 20-40% și monocitele, respectiv, 4-8%.

Granulocitele *neutrofile* sunt produse în măduva osoasă, în interval de 12 zile. Ele au diametrul de 10-15 μm și se pot deplasa cu o viteză de 2-3 mm/oră, prin emitere de pseudopode. Numărul de neutrofile variază între 2500-5700/mm^3.

Granulocitele *eozinofile* au un diametru de 10-16 μm și o durată de viața de 5-8 ore. Ca și neutrofilele, au proprietatea de a migra și a fagocita sub acțiunea factorilor chemotactici. Valoarea normală a eozinofilelor este cuprinsă între 100-200/mm^3.

Limfocitele sunt localizate în modul următor: 4% în sîngele periferic, 70% în organele limfatice, 10% în măduva oaselor, și restul în alte țesuturi. După durata vieții se diferențiază

Tabela 8.1. *Afecțiunile eritrocitare mai frecvente*

№	Afecțiunea	Cauza	Manifestările
1.	Anemia falciformă (drepanocitară)	-Codonul 6 din gena lanțului β Hb se transformă din GAG (sau GAA) în GTG (sau GTA), ce determină înlocuirea în proteină a Val cu Glu.	- Eritrocitele au formă de seceră, datorită agregării moleculelor HbS. - Anemie severă.
2.	Talasemiile: A.α-talasemia; B.β-talasemia.	-Mutații variate în gena lanțului α sau β al Hb (deleții extinse, nonsens mutații, crossing-over defectuos etc).	- Încetinirea biosintezei lanțurilor α sau β ale Hb-ei. - Hiperproducerea celuilalt tip de lanț. - Producerea de lanțuri atipice - g, d etc. - Incapacitatea de oxigenare a țesuturilor. - Deces precoce la homozigoți.
3.	Sferocitoza ereditară	-Dereglări structurale sau cantitative ale α- sau β-spectrinei, ankirinei, proteinelor 3 sau 4.1.	- Microsferocitoză. - Scade elasticitatea lor și ele sunt deteriorate în patul microcirculator. - Celulele deteriorate sunt distruse accelerat în splină, conducînd la anemie.
4.	Deficiența ereditară a glucozo-6-fosfat dehidrogenazei	-Mutații punctiforme în gena glucozo-6-fosfat dehidrogenazei (X).	- Scade sinteza NADPH-ului și reducerile glutationului și ale metHb. - Se modifică structura și permeabilitatea membranei. - Apar anomalii ale ATP-ului. - Anemie hemolitică.
5.	Deficiența ereditară a piruvatkinazei	- Mutații în gena izoenzimei eritrocitare a piruvatkinazei.	- Scade viteza glicolizei și cantitatea ATP-ului. - Scade cantitatea 2,3-difosfogliceratului. - Crește cantitatea NADH-ului. - Anemie și reticulocitoză.
6.	Methemoglobinemia	- Aportul excesiv de oxidanți (xenobiotici sau medicamente). - Carență genetică a met Hb reductaze-lor NADH-dependente I și II. - Hemoglobinoza Hb M - His (8) este substituită prin Tyr.	- Fierul este trivalent (Fe^{3+}). - Reducerea afinității față de O_2. - Policitemie (creșterea numărului celulelor roșii).
7.	Anemie megaloblastică	- Carența vitaminei B_{12} datorată absorbției scăzute în stomac. - Carența acidului folic din cauza aportului scăzut, dereglării absorbției sau a necesităților crescute (de exemplu, la gravide).	- Macrocitoza (12 µm și mai mult). - Poichilocitoză. - Creșterea concentrației hemoglobinei eritrocitare cu hipercromie. - Leucopenie. - Trombocitopenie.

două grupe de limfocite: a) cu durată scurtă – 7-12 zile ce constituie 10% din total; b) cu durată lungă – 500-800 zile (90%). În sîngele periferic 65-80% sunt T-limfocitele, 10-30% – B-limfocitele şi 2-10% – NK-limfocitele (Natural Killer). Valoarea normală a limfocitelor este de 1000-4500/mm^3(1,0-4,5 x 10^9/L).

Monocitele sunt produse în măduva osoasă şi organele limfopoetice. Ele (300-800/mm^3) rămîn în circulaţie cca 24 ore, după care migrează în ţesuturi şi se transformă în macrofage.

Mecanismele biochimice ale granulocitopoiezei

Medula osoasă conţine cca de 24 ori mai multe granulocite decît sunt prezente în circulaţia periferică. Sinteza celulelor mielocitare este reglată de *granulopoietină* şi de *factorul stimulator al coloniilor celulare (FSC)*. Trecerea celulelor imature din vasele şi sinusoidele medulare în circuitul periferic este condiţionată de acţiunea "inductorului leucocitozei". În sînge proliferarea granulocitară este reglată de doi factori antagonişti: *chalona* – inhibitorul proliferării granulocitare, şi *antichalona* – stimulatorul ei. Evolutiv, metabolismul celular (de la promieloblast la granulocit) parcurge două faze. În celulă iniţial (I fază) predomină procesele energetice în raport cu cele hidrolitice: lipsesc peroxidazele specifice mielocitelor, enzimele metabolismului glicogenului şi substanţa în sine. În faza a doua (delimitată de apariţia granulaţiilor) începe producerea mieloperoxidazelor, enzimelor glicogenogenezei şi glicogenolizei. Semnificativ se activează hidrolazele, enzimele ciclului pentozo-fosfaţilor şi glicolizei anaerobe. Concomitent, se reduce aproape pînă la dispariţie aparatul mitocondrial energogenerator.

Particularităţile compoziţiei granulocitelor

Celulele precursoare (promielocitul, mielocitul) conţin granulaţii primare azurofile. Celulele mature se devizează în dependenţă de natura şi coloraţia granulaţiei în neutrofile, eozinofile şi bazofile. Aceste granulaţii secundare sunt în conexiune cu aparatul Golgi. *Granulaţiile neutrofile* conţin proteine bazice şi numeroase enzime hidrolitice: fosfataza alcalină, β-glucuronidaze, lizozimul, nucleotidaze, ribonucleaza, peroxidaza, colagenaza şi alte peptidaze. De asemenea, ele conţin urme de fosfatază acidă, un eter al acidului hialuronic, o cantitate importantă de glicogen şi *fagocitină*. Ultima este o substanţă intens bactericidă. *Granulaţiile eozinofile* sunt compuse dintr-un nucleu dens de fosfolipide şi enzime înconjurat de o membrană. Bagajul enzimatic este bogat în oxidaze, peroxidaze, catalază, fosfatază alcalină, lipază, amilază, dar nu conţin lizozim şi fagocitină. *Granulaţiile bazofile* sunt depozite de histamină, heparină, bradikinină, serotonină şi enzime lizozomale.

În granulocite sunt prezente numeroase substanţe implicate în protecţia organismului de bacterii, virusuri şi compuşi străini. Neutrofilele conţin (cu excepţia fagocitinei menţionate anterior) *defensine* şi *lactoferina*. Defensinele sunt peptide bazice (20-33 resturi de aminoacizi), cu proprietăţi antibiotice. Ele distrug bacteriile, deteriorîndu-le membranele celulare. Lactoferina este o proteină fixatoare de fier, ce inhibă creşterea anumitelor bacterii sensibile la fier, acţionînd ca agent prooxidant. De asemenea, ea poate fi un reglator al proliferării celulelor seriei mielocitare.

Eozinofilele conţin o proteină bazică bogată în arginină cu rol de protecţie contra paraziţilor, o peroxidază eozinofilică ce produce peroxidul de hidrogen, care distruge

microorganismele, şi o proteină de tip neurotoxic cu efect marcat.

Bazofilele şi mastocitele nu conţin substanţe bactericide specifice, dar sunt sursa unor cantităţi semnificative de mediatori, în principal, histamina.

Mediatorii sunt prezenţi şi în celulele celorlalte serii granulocitare. Astfel, în neutrofile au fost identificate prostaglandinele, leucotrienele şi factorul activator al plachetelor (Platelet Activating Factor - PAF), iar în eozinofile–leucotriene (C_4).

Membranele granulocitelor conţin o clasă de proteine specifice – *integrinele*. Ele asigură aderarea granulocitelor, în special a neutrofilelor, la celulele endoteliale vasculare ce posedă receptori specifici sau liganzi. Integrinele sunt dimeri formaţi din subunităţi α şi β de diferite tipuri. Ele posedă 3 domenii distincte – extracelular, transmembranar şi intracelular. Integrinele realizează conexiunea dintre mediul ambiant celulei şi cel interior şi contribuie la răspunsul ei la schimbările mediului. Răspunsul celular include migrarea chemotactică, penetrarea în ţesut şi fagocitoza.

Membranele neutrofilelor sunt înzestrate cu receptori specifici domeniilor 9_c ale IgG. Receptorii fixează complexele antigen-anticorp, facilitînd fagocitoza.

Bazofilele şi mastocitele posedă receptori faţă de IgE. Ataşarea complexelor antigen-anticorp la ele induc eliberarea mediatorilor şi declanşează reacţiile vasculare şi tisulare locale, care reprezintă cauza manifestărilor alergice.

Particularităţile metabolismului granulocitelor

Metabolismul energetic este asigurat prin catabolismul glucidelor. Glicogenul (1-2% din greutatea celulei) scade rapid în timpul fagocitozei. Concomitent sunt activate glicoliza şi consumul de oxigen.

Granulocitele se caracterizează printr-o intensitate deosebit de mare a glicolizei. În formele imature procesul este preponderent aerob, urmat de căile mitocondriale de generare a ATP-ului. În celula matură predomină glicoliza anaerobă, activitatea enzimelor ciclului Krebs şi a fosforilării oxidative, cu intensitate moderată. Generarea ATP-ului prin glicoliza anaerobă atinge cote înalte în fagocitoză, pentru întreţinerea energetică a procesului.

În granulocit o activitate mare are şi ciclul pentozo-fosfaţilor, care produce NADPH utilizat ulterior la formarea H_2O_2 necesara bactericidiei. Catabolismul lipidelor reprezintă o sursă energetică secundară ce complementează degradarea glucidelor. Sinteza proteinelor în granulocite este intensă şi este asigurată de conţinutul înalt de aminoacizi liberi. Procesele metabolice menţionate anterior susţin funcţiile fundamentale ale granulocitelor.

Neutrofilul exercită două funcţii. Funcţia majoră: *fagocitoza* – o parte a mecanismelor de protecţie. Funcţia secundară este cea secretorie. Granulocitele neutrofile secretă *transcobalamina I* – o α_2-globulină care leagă şi transportă vitamina B_{12} (cobalamina).

Fagocitoza se desfăşoară în 3 etape:

a) activarea neutrofilului şi chemotaxia;
b) fagocitoza propriu-zisă;
c) bactericidia.

Activarea neutrofilelor este indusă de ataşarea la receptorii specifici de pe membrana celulară a bacteriilor, complexelor antigen-anticorp sau a unor factori chemotactici, ca

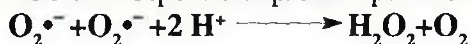
proteine ale sistemului complementului (îndeosebi C_3), produse ale degradării colagenului și fibrinei, mediatori ai inflamației (kalicreina) etc. Creșterea rezultantă a concentrației Ca^{2+} citoplasmatic influențează asamblarea sistemului de tubuli și a sistemului actin-miozină. Aceste două sisteme sunt implicate în secreția conținutului granulațiilor și în motilitatea celulară. Granulocitul emite pseudopode ce captează și înglobează în celulă compusul străin. Se formează *fagosomul* – vacuola de fagocitoză ce fuzionează cu granulațiile neutrofilelor. Se elimină enzimele hidrolitice ce distrug peretele bacterian-primar și ulterior celelalte elemente celulare.

F*agocitoza și bactericidia* sunt însoțite de o amplificare extremă a consumului oxigenului ce poartă denumirea de "explozie respiratorie" ("*respiratory burst*"). Oxigenul este utilizat pentru a produce cantități mari de derivați activi ca: peroxidul de hidrogen (H_2O_2), radicalii superoxid și hidroxil ($O_2^{\bullet-}$ și $OH^{\bullet}$), ionul hipoclorid (OCl^-). Acești compuși sunt agenți microbicizi. $O_2^{\bullet-}$ este sintetizat de NADPH-oxidaza. Enzima este organizată și funcționează ca un lanț de transport al electronilor, similar cu lanțul respirator. Lanțul include NADPH-ul, cit.b_{558} și două proteine citoplasmatice, ce se atașează la membrană pentru a cataliza următoarea reacție:



$$2O_2 + NADPH + H^+ \longrightarrow 2O_2^{\bullet-} + NADP^+$$

Din superoxidanion radical spontan se produce peroxid de hidrogen, conform ecuației:



$$O_2^{\bullet-} + O_2^{\bullet-} + 2H^+ \longrightarrow H_2O_2 + O_2$$

Peroxidul de hidrogen este substratul mieloperoxidazei ce produce hipocloridul:



$$H_2O_2 + Cl^- + H^+ \longrightarrow OCl^- + OH^{\bullet}$$

Cel mai frecvent este Cl^-, datorită concentrației intracelulare considerabile a ionului, dar pot fi și anionii de Br^-, I^-, SCN^-.

Enzimele și substanțele active ce participă la bactericidiă sunt izolate primar în granulațiile neutrofilelor și ulterior în fagosom. Astfel, celula și mediul ambiant sunt protejate de acțiunea lor distructivă. Linia a doua de protecție este realizată de: a) superoxiddismutaza, catalaza, sistemul glutationului ce inactivează formele agresive ale oxigenului; b) antiproteinazele ce neutralizează acțiunea enzimelor proteolitice lizozomale.

Fagocitoza poate fi stopată prin utilizarea *acidului monoiodacetic* (inhibitor al glicolizei anaerobe). Consumul de oxigen crescut și producerea de apă oxigenată ar proveni și din oxidarea NADH prin acțiunea NADH-oxidazei. Legătura între cele două sisteme NADPH-oxidază și NADH-oxidază se stabilește prin reacții auxiliare de tipul *transhidrogenazei* (vezi reacțiile):



a) $NADH + H^+ + O_2 \xleftrightarrow{\text{NADH-oxidaza}} NAD^+ + H_2O_2$;

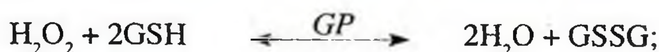


b) $NADPH + H^+ + O_2 \xleftrightarrow{\text{NADPH-oxidaza}} NADP^+ + H_2O_2$;



c) $NAD^+ + NADPH \xleftrightarrow{\text{Transhidrogeneza}} NADH + NADP^+$.

Implicarea glutationului în sistemul de apărare poate fi ilustrat în modul următor:



$H_2O_2 + 2GSH \xleftrightarrow{GP} 2H_2O + GSSG$;



$GSSG + NADPH + H^+ \xleftrightarrow{GR} 2GSH + NADP^+$.

Vacuola fagocitară (fagosoma) nu poate fi eliminată din celulă şi conţinutul ei se revarsă în celulă, distrugînd-o.

Eozinofilele funcţional sunt implicate în procesele alergice. Ele limitează afectările produse prin complexele imune. Funcţia lor principală este fagocitarea complexelor antigen-anticorp şi eliminarea histaminei secretate de bazofile în timpul reacţiei alergice. Migrarea chemotaxică a eozinofilelor spre elementul fagocitat este stimulată de complexele antigen-anticorp, proteinele sistemului complementului (C_5; C_6; C_7), fibrină, serotonină, histamină, imunoglobulinele G. Mecanismele fagocitării şi dezintegrării corpului străin nu sunt cunoscute în detalii.

Bazofilele sunt celule implicate în reacţiile inflamatorii şi alergice, prin producerea şi depozitarea mediatorilor. Prin degranularea lor se elimină histamină, bradikinină, serotonină şi numeroase enzime lizozomale. Aceste celule joacă rol important în reacţiile alergice determinate de IgE, deoarece ele au tendinţa de a se ataşa de celulă. Bazofilele sunt corelate şi cu echilibrul fluido-coagulant, prin producerea şi eliberarea heparinei.

Afecţiunile majore ale leucocitelor

Se cunosc mai multe afecţiuni ereditare ale leucocitului ce dereglează principala funcţie a celulei.

Deficienţa aderării leucocitelor de tip I (type I- leukocyte adhesion deficiency) este cauzată de deficienţa subunităţilor de tip β_2 în integrinele LFA-1 ale neutrofilelor şi macrofagelor. În această afecţiune este diminuată aderarea leucocitelor la celulele endoteliale şi un număr mai scăzut de neutrofile pot pătrunde în ţesuturi pentru a combate infecţia. Astfel, persoanele afectate suferă de infecţii bacteriene şi micoze recurente.

Mutaţiile în genele ce codifică componentele sistemului NADPH-oxidazic sunt cauza *granulomatozei cronice*. Afecţiunea este relativ rară şi se manifestă prin infecţii recurente şi granuloame întinse pe piele, în pulmoni şi ganglionii limfatici. Granuloamele se formează în tentativa de a izola şi elimina bacteriile ce nu au fost distruse din cauza activităţii insuficiente a sistemului NADPH-oxidazic. Defectul genetic afectează producerea a patru proteine-enzime ale sistemului şi diminuează sever producerea substanţelor bactericide (H_2O_2, $O_2^{\bullet-}$, $OH^\bullet$).

Caracteristica biochimică a monocitului

Monocitele se produc în măduva osoasă şi organele limfopoietice. După o circulare de 24 ore în sînge, ele migrează în ţesuturi şi se diferenţiază în macrofage. Fenomenul este concordat cu modificarea metabolismului celulei respective.

Monocitele-macrofage sunt localizate în ganglionii limfatici, splină, măduva osoasă, la nivelul tuturor seroaselor (pleură, pericard, peritoneu), piele, pulmoni, ficat, sistem nervos central.

Macrofagele pulmonare se caracterizează prin metabolism energetic aerob, cu activitate semnificativă a enzimelor ciclului Krebs şi a lanţului respirator. În celelalte ţesuturi ele sunt energetic dependente de glicoliza anaerobă. Toate macrofagele au conţinut bogat şi variat de esteraze. Atît monocitele, cît şi macrofagele secretă substanţe cu activitate bactericidă (*lizozim*), antivirală (*interferonul*) şi stimulatori ai activării şi diferenţierii limfocitelor în plasmocite (*interleukina-1*).

Monocitele-macrofage în țesuturi fagocitează intens bacterii, resturi celulare mari și celule sanguine îmbătrînite.

Caracteristica biochimică a limfocitelor

Limfocitele se formează în sistemul limforeticular (timus, măduvă osoasă, ganglioni limfatici, splină, țesut limfatic al tractului digestiv, amigdale) și ajung în circulație pe cale limfatică. Limfocitele circulă continuu pe traseul: organe limfatice – limfă – sînge – țesut – limfă. Limfocitele se divizează în tipurile T și B, în dependență de origine – timus (T) și medula osoasă (B).

Limfocitele T fixează la suprafața lor cantități minime de imunoglobuline. Ele îndeplinesc multiple funcții – mediază protecția organismului față de microorganisme, virusuri și fungi; controlează funcțiile limfocitelor B și cooperează cu ele în producerea anticorpilor; resping grefele de organe incompatibile; intervin în reacțiile de hipersensibilitate.

Limfocitele T realizează *imunitatea celulară*. Ele posedă în membrana celulară receptori specifici pentru diverse antigene, ce determină existența a numeroase clone individualizate prin capacitatea de a interacționa specific cu un anumit antigen. Imunitatea celulară se realizează prin două mecanisme: producerea limfokinelor și activitatea citotoxică. Limfokinele sunt mediatori cu structură variată care au anumit efect asupra celulelor-țintă. Prin acțiunea citotoxică se asigură distrugerea citolitică a celulei-țintă. Ambele efecte condiționează eliberarea organismului de microorganisme, virusuri, celule tumorale etc.

Limfocitele B exercită *imunitatea umorală* mediată de anticorpi (imunoglobuline). Limfocitele B se divid în numeroase "familii", fiecare avînd propria specificitate de interacțiune cu un anumit antigen. În urma acestei interacțiuni, ele se transformă în plasmocite ce produc imunoglobuline specifice.

Limfocitele NK ("Natural Killer") nu posedă receptori specifici membranari față de anumiți antigeni. Ele distrug celulele tumorale și cele infectate de virusuri. Din majoritatea studiilor se confirmă concluzia că profilul energetic al limfocitului, celulă funcțional multipotentă, este de tip oxidativ, aerob.

Particularitățile compoziției chimice și ale metabolismului trombocitelor

Trombocitele sunt cele mai mici elemente figurate sanguine. Diametrul lor constituie 2,5-5 µm. Trombocitele sunt produse de măduvă osoasă, cu o viteză medie de 3300/minut. Au o durată de viață medie de 8-10 zile. Sîngele periferic conține 1300-400 000/μm^3 ($130-400 \times 10^9/L$), din care 2/3 în circulație și 1/3 rezervate în splină.

Particularitățile compoziției chimice a trombocitului

Proteinele constituie o parte importantă din trombocite (cca 52% din masa uscată). Importanță deosebită o au *integrinele membranare* ce asigură aderarea trombocitelor la suprafața lezată a vasului. În acest proces intervin GP Ia – IIa și GP Ib – V – IX ce asigură fixarea plachetelor direct la colagen sau prin intermediul *factorului von Willebrand*. Principalele integrine membranare sunt prezentate în tabelul 8.2.

De asemenea, membrana trombocitelor conține receptori la ADP, serotonină și adrenalină – substanțe ce participă la hemostază.

N	Glicoproteina	Rolul funcțional
1	GP I a (s)	Aderența trombocitelor
2	GP I b	Receptori pentru factorul von Willebrand și trombină
3	GP II b	Receptori pentru fibrinogen și factorul von Willebrand
4	GP V	Receptori pentru trombină
5	GP IX	Se leagă cu GP Ib.

Tabela 8.2 Principalele integrine trombocitare

În citoplasmă se găsesc *plecstrina, calmodulina și kinaza lanțurilor ușoare ale miozinei* ce intervin în activarea plachetelor, în coagularea sîngelui. Lanțurile ușoare ale miozinei sunt parte integrală a *actomiozinei* – proteină contractilă ce modifică forma trombocitului din discoidală în sferică, în cadrul metamorfozei vîscoase a celulei.

Setul enzimatic al trombocitelor este adaptat la realizarea funcției hemostatice. El conține adenilatciclaza, Na^{+}/K^{+} - ATPaza, fosfolipaza A_2, ciclooxigenaza, tromboxan sintetaza ce generează mediatorii intracelulari ai hemostazei. Necesitățile energetice sunt acoperite prin glicoliză, ciclul pentozo-fosfaților, ciclul Krebs și lanțul respirator, enzimele cărora sunt extrem de active. Cantitatea de ATP produsă este de cca 150 ori mai mare decît în eritrocit, iar conținutul de ADP depășește concentrațiile medii din alte celule. ADP-ul trombocitar este nu atît compus macroergic, cît mediator al hemostazei. Hidrolazele acide (proteazele, esterazele etc.) sunt concentrate în lizozomi. Ei mai conțin un șir de factori proprii și depozitați, responsabili de buna decurgere a coagulării sanguine – fibrinogenul, fibronectina, ß-trombomodulina, adezinele, factorii chemotactici leucocitari etc.

În granulele dense ale trombocitelor sunt concentrați ionii de Ca^{2+} sub formă legată de *calsechestrină*. Ca^{2+} este eliberat în timpul activării plachetelor și acționează ca mesager secund intracelular.

Factorii plachetari ai coagulării sunt depozitați în plachete, dar provin atît din celulă, cît și din plasmă (descriși mai jos).

Particularitățile metabolismului trombocitelor

Metabolismul trombocitelor este analogic, în multe aspecte, cu metabolismul mușchiului striat de "salt" (ce funcționează periodic cu lungi intervale de repaus) pînă în momentul activării hemostazei. Activarea hemostazei și a trombocitului este însoțită de intensificarea maxim posibilă a proceselor energogeneratoare și a consumului ATP-ului. ATP-ul este generat atît în fază de repaus, cît și în timpul activării prin glicogenoliză, glicoliză, ciclul Krebs și fosforilare oxidativă. Consumul ATP-ului în procesul metamorfozei vîscoase și a retracției cheagului este catalizată de ATP-aza. În trombocit ATP-ul nu poate fi refăcut din contul creatin fosfatului din lipsa enzimei creatinfosfat kinaza. ATP-ul este necesar pentru fosforilarea lanțurilor miozinei și asamblarea actomiozinei. Proteina contractilă participă la modificarea formei celulei în cadrul metamorfozei vîscoase. Fosfatul ATP-ului este utilizat și pentru fosforilarea *plecstrinei* ce realizează agregarea granulelor trombocitului și eliberarea conținutului lor.

Metabolismul proteinelor este intens în trombocit. Sinteza lor este în principal localizată în ribozomi. Cantități mici de proteine se sintetizează în mitocondrii ce posedă DNA și

RNA. De exemplu, în mitocondrii este sintetizat *factorul XIII – factorul de stabilizare a fibrinei.* O cantitate considerabilă de aminoacizi sunt deturnați din sinteza proteică spre producerea mediatorilor necesari hemostazei – serotoninei, adrenalinei, noradrenalinei.

Un şir de mediatori interni şi externi sunt produşi din lipidele trombocitare. Activarea plachetară este însoţită de scindarea fosfolipidelor şi eliberarea acidului arahidonic. Ultimul este precursorul tromboxanului A_2 sintetizat pe calea ciclooxigenazică. *Fosfatidilinozitol-4,5-bisfosfatul* este substratul din care se produc concomitent doi mediatori ai activării plachetelor – *diacilglicerolul şi inozitol-1,4,5-trifosfatul.*

Mecanismele biochimice ale funcţiilor trombocitelor

Hemostaza este funcţia fundamentală a trombocitelor. Ele participă în toţi cei patru timpi ai procesului. Secundar, plachetele sanguine intervin în protecţia imună, prin fagocitoza complexelor imune şi a particulelor virale, şi în protecţia peretului vascular, prin infiltrarea lor în stratul endotelial.

În condiţii normale, trombocitele circulă în sînge în formă neactivă, discoidală. În hemostază sau tromboză, ele se activează şi contribuie la formarea cheagului. Procesul activării are 3 etape: 1) aderarea lor la colagenul vascular; 2) eliberarea conţinutului granulelor; 3) agregarea celulelor.

Trombocitele aderă la colagenul vascular expus prin receptorii specifici de pe membrana celulară – GP Ia-IIa ($\alpha_2\beta_1$-integrina) într-o reacţie ce implică factorul von Willebrand. Ultimul se leagă concomitent la trombocite prin GP Ib-V-IX şi colagen sau subendoteliul vascular. Plachetele ce au aderat la colagen, îşi modifică forma şi pătrund în subendoteliu, unde eliberează conţinutul granulelor dense şi alfa (α).

Secreţia granulară este, de asemenea, stimulată de trombină. Ea se formează în cascadele coagulării, este cel mai puternic activator al trombocitelor şi iniţiază procesul, interacţionînd cu un receptor membranar. Evenimentele ce urmează sunt similare transmiterii mesajului hormonal în interiorul celulei. Complexul trombină-receptor, prin intermediul proteinei G, activează fosfolipaza C care, la rîndul său, hidrolizează fosfatidilinozitol-4,5-bisfosfatul membranar la două molecule mesagere intracelulare – diacilglicerolul şi inozitol–1,4,5-trifosfatul.

Diacilglicerolul activează *proteinkinaza C* ce fosforilează *plecstrina.* Ca rezultat, are loc agregarea granulelor şi eliberarea conţinutului lor. Serotonina şi adrenalina eliminate determină constricţia vasului lezat, iar ADP-ul activează alte trombocite, amplificînd agregarea lor.

Inozitol-1,4,5-trifosfatul induce eliberarea Ca^{2+} din sistemul tubular. Ca^{2+} interacţionează cu calmodulina şi kinaza lanţurilor uşoare ale miozinei. Activarea lor induce fosforilarea miozinei, interacţiunea ei cu actina şi modificarea formei trombocitului din discoidală în sferică.

Interacţiunea receptorilor plachetari cu colagenul vascular denudat activează o altă cale mesagerială. Complexul colagen-receptor activează *fosfolipaza A_2* ce hidrolizează acidul arahidonic din fosfolipidele bistratului membranar. Arahidonatul serveşte drept substrat în biosinteza *tromboxanului A_2* care, într-o manieră receptor-mediată, activează *fosfolipaza C,* promovînd agregarea trombocitelor.

Trombocitele active sunt necesare nu numai pentru formarea cheagului alb instabil plachetar, dar şi pentru activarea unor factori plasmatici ai coagulării. Fosfolipidele anionice membranare accelerează reacţiile activării *factorilor Stuart-Prower (X)* şi a protrombinei (II), ce constituie etapele-cheie ale cascadelor coagulării sanguine.

Toţi agreganţii trombocitelor (colagenul, trombina, ADP, factorul activator al plachetelor etc.) modifică suprafaţa celulei în aşa mod încît să fie favorizată ataşarea fibrinogenului la complexul GP IIb–IIIa ($\alpha_{IIb}\beta_3$ integrina) de pe membrana trombocitului activat. Astfel, se formează o reţea de fibrinogen divalent şi trombocite agregate. Sinergiştii acestui proces sunt adrenalina, serotonina şi vasopresina.

Dereglările metabolismului trombocitelor

Tulburările metabolismului trombocitar implică faza vasoplachetară a coagulării şi pot fi ereditare şi dobîndite. Dereglările ereditare ale funcţiilor plachetelor afectează adeziunea la peretele vascular, eliberarea factorilor plachetari ai coagulării sau agregarea celulelor la porţiunea lezată a vasului.

Sindromul plachetelor gigante sau Bernard-Soulier este determinat de absenţa glicoproteinelor GP Ia (s) şi GP Ib ce afectează agregarea celulelor. Afecţiunea se transmite autozomal recesiv. Ea se manifestă prin mărirea semnificativă a dimensiunilor trombocitelor (sunt similare celor ale limfocitelor); prelungirea marcantă a timpului de sîngerare-coagulare (cca 15 min); hemoragii intracutanate în mucoase, pulmoni, tractele digestiv şi urogenital.

Sindromul Willebrand-Jurgens reprezintă o afecţiune cu transmitere autozomal dominantă. Este dereglată biosinteza *factorului von Willebrand (F-vW)* ce este parte integrală a complexului VIII. Carenţa F-vW diminuează capacitatea de adezuine a plachetelor şi, ca urmare, se măreşte timpul de sîngerare-coagulare.

Sindromul Glanzmann sau trombostenia ereditară are transmisie autozomal recesivă. Pacienţii denotă lipsa glicoproteinelor membranare GP IIb şi GP IIIa ce asigură interacţiunea cu fibrinogenul şi F-vW. Trombocitele sunt mici şi rotunde şi nu se supun metamorfozei vîscoase. Este modificată eliberarea F-3 şi nu se retractă cheagul.

Storage pool disease (boala rezervorului de depozitare) este o tulburare a eliberării factorilor plachetari. Cauza ei este dereglarea sintezei ciclooxigenazei şi scăderea considerabilă sau lipsa Ca^{2+} din plachete.

CONSTITUENŢII MINERALI AI PLASMEI

Principalul constituent mineral al plasmei este *apa* care îndeplineşte funcţia de solvent pentru toate componentele ei. Gazele sanguine, oxigenul şi bioxidul de carbon sunt parţial dizolvate în plasmă, proporţional cu presiunea parţială a fiecărei componente. Preponderent, gazele sunt legate chimic de hemoglobină. CO_2 din sînge se găseşte şi în plasmă, sub formă de combinaţii multiple cu ionii bicarbonici – HCO_3^-.

Substanţele minerale dizolvate în plasmă sunt în stare ionică, determinînd echilibrul între anioni şi cationi.

Cationii. *Sodiul (Na^+)* este principalul factor al reglării presiunii osmotice şi echilibrului acido-bazic. Na^+ prezintă cationul umorilor, atingînd în plasmă concentraţia de 152 mEq/L. Între concentraţia ionilor de Na^+ (extracelular) şi ionului de K^+ (intracelular) există un echilibru ce se realizează printr-un mecanism activ la nivelul membranelor celulare – Na^+/K^+-ATP-aza. Dereglările concentraţiei ionului de Na^+ depind de repartiţia apei în

diferite compartimente. Valori normale: 133 - 147 mmol/L.

Potasiul (K^+) este cationul spațiilor intracelulare, reprezentînd 90% din totalul de K^+ al organismului (150 g ce corespund la 3500 mEq la omul de 70 kg); concentrația în plasmă este de 4,7 mEq ±02, mEq/L plasma. Valori normale: 3,4 - 4,5 mmol/L.

Se cunosc variații patologice – hiper- și hipokalemii. *Hipokalemia* este insoțită de tulburări neuromusculare și cardiace asociate cu alcaloza metabolică. Mult mai rare sunt *hiperkalemiile*, dar ele pot duce la consecințe grave, adesea ireversibile, cu paralizie și oprirea inimii în diastolă.

Calciul are un conținut plasmatic de 2,3 - 2,75 mmol/L. La omul adult conținutul total constituie 1100-1500g. Cationul este reprezentat prin trei fracțiuni: a) ultrafiltrabilă ionizată, ce prezintă 60% din total, fiind forma activă implicată în osificare, coagulare, excitabilitate neuromusculară; b) ultrafiltrabilă neionizată, reprezentînd 4% din total – fixat în combinații saline sau complexe nedisociabile; c) neutră filtrabilă, cu o cotă de 36% din calciul total sub formă de proteinat de calciu.

Ionii de Ca^{++} sunt necesari pentru activitatea unor enzime, cum ar fi cele implicate în procesele de coagulare și pentru agregarea plăcuțelor sanguine. Ei reduc excitabilitatea neuromusculară în musculatura scheletică, producînd însă o creștere a contractilității miocardului – intervenții realizate prin modificări în permeabilitatea membranelor celulare. Grație încărcăturii pozitive (2^+) și volumului lor mic, ionii de calciu formează legături cu radicalii electronegativi ai moleculelor proteice și fosfolipidelor membranare. Aceste modificări influențează repartiția ionilor și potențialului electric al celulelor, respectiv excitabilitatea lor. În lipsa unor stimulenți, calciul se găsește în celulă sub formă inactivă, neionizată, stocată în forme de depozit. Stimulenții (inozitolfosfații) produc un flux de calciu ionic spre citoplasmă, activînd sistemele enzimatice și modificînd funcția celulelor.

Se descriu variații sub formă de hipo- și hipercalcemii. În patologia umană, mai ales a copilului, *hipocalcemia* este asociată cu sindromul de tetanie. Insuficiența paratiroidiană, rahitismul, lipsa vit.D, osteodistrofia renală sau valorile majore de tireocalcitonină – toate pot duce la hipocalcemii severe. *Hipercalcemiile* se intîlnesc în distrugerile osoase, mielomul multiplu, osteoliza malignă, hiperparatiroidism ș.a.

Magneziul – conținutul variază între 0,7-1,2 mmol/L. Magneziul plasmatic este 70% ultrafiltrabil, restul fiind legat de albumine, α_1 și β_2 globuline. În organism este distribuit inegal, avînd o concentrație mai mare în țesuturile cu activitate metabolică majoră – creierul, inima, ficatul, tiroida, rinichii.

Principalele organe implicate în metabolismul Mg sunt intestinul și rinichii. Provine magneziul, în special, din verdețuri, pește, carne. 30-50% din Mg ingerat este asimilat la nivelul intestinului prin absorbție facilitată și pasivă. Majorează absorbția vit.D și forma sa activă. Alcoolul sporește eliminările urinare de magneziu.

Veriga importantă în reglarea metabolismului Mg este situată la nivel renal, filtrînd circa 2,5g Mg, din care reabsoarbe 95%, excretînd 100 mg/zi. Controlul eliminării renale e influențat de multipli factori – PTH, T_4, glucocorticoizii, aldosteronul. Magneziul este implicat într-o gamă largă de reacții biochimice, avînd un impact activator direct asupra unor enzime, ca: fosfofructo-kinaza, creatin kinaza, adenilatciclaza. Intervine în sinteza, transportul și utilizarea compușilor macroergici – ATP; asigură în mitocondrii cuplarea

oxidării cu fosforilarea. Participă la sinteza acizilor nucleici şi a proteinelor, intervenind în activarea aminoacizilor. Are importanţă majoră în reglarea contracţiei musculare şi conducerea impulsului nervos. Mg intervine în transferul ionic (K^+) şi modulează activitatea canalelor de calciu. Magneziul are misiunea de stabilizator al membranelor celulare, precum şi al ribozomilor şi lizozomilor, în deficitul de Mg se intensifică degranularea mastocitelor şi bazofilelor.

Deficitul de magneziu este întîlnit frecvent. Aportul deficitar în alimentaţia parenterală, creşterea eliminărilor urinare la administrarea soluţiilor glucozate, curele de slăbire sunt însoţite de instalarea unei hipomagneziemii. În maladiile ce evoluează cu malabsorbţie, în alcoolismul cronic deficitul de Mg poate agrava manifestările clinice ale carenţei unor vitamine (B_1, B_6, B_{12}). În hiperaldosteronismul primar sau secundar, în exces de catecolamine se accentuează deficitul de Mg, asociat cu hipokalemii în insuficienţa cardiacă.

Anionii. *Clorul* e anionul cel mai important al compartimentului extracelular, avînd o concentraţie plasmatică de 94-111 mmol/L. Concentraţia clorului urmează pasiv modificările de concentraţie ale ionilor de Na^+. Excepţie prezintă: în alcaloza metabolică se întîlneşte hipocloremia, iar în acidoza metabolică – hipercloremia.

Concentraţiile plasmatice de Cl şi de Na depind mult de modificările volumului de apă extracelulară şi, implicit, de gradul de diluţie a electroliţilor.

Sulful se găseşte în plasmă sub mai multe forme care, însumate, alcătuiesc sulful total, corespunzător unei concentraţii de 1,40 g/L. Partea majoră este reprezentată de aminoacizi, proteine sanguine. Sulful neproteic conţine două fracţii: sulful neutru (aminoacizii şi derivaţii tiol) şi sulful oxidat (sulfatul, esterii), cu un nivel cuprins între 0,01-0,03 g/L.

Fosforul este un element abundent în organismul uman. Circa 80% din toată cantitatea (700g la omul adult) este depozitată în schelet sub formă de hidroxiapatită. Restul se găseşte în lichidul extracelular şi în ţesuturile moi. Majoritatea fosforului este combinată cu lipide, proteine şi hidraţi de carbon, participînd la formarea fosfolipidelor, nucleotidelor, compuşilor macroergici. De asemenea, fosfaţii constituie unul din sistemele - tampon ale organismului.

Concentraţia fosforului variază în limitele 0,8-1,51 mmol/L. Copiii în creştere au niveluri mai înalte, între 1,3-2,25 mmol/L. O dietă bogată de glucide poate scădea nivelul fosforului. Fosforul practic este prezent în toate alimentele şi o carenţă alimentară poate fi exclusă. Majoritatea fosforului provine din lapte şi produse lactate. Creşte necesarul de fosfaţi în timpul sarcinii şi lactaţiei.

Se consideră că 2/3 din fosforul ingerat este absorbit în jejun printr-un proces activ energodependent. În malabsorbţie, în boli hepatice, intoxicaţii cu metale grele şi aport alimentar crescut de fitaţi este diminuată absorbţia lui intestinală. În cazul unei diete sărace în calciu, absorbţia fosforului sporeşte.

Fosfatul este o substanţă cu prag renal: la o concentraţie plasmatică sub 1 mmol/L, acestă nu se elimină prin urină. La nivelul glomerulilor sunt absorbite 80-95% din fosfatul filtrat. Parathormonul stimulează eliminarea renală a fosfaţilor, reducînd reabsorbţia lor. O creştere a fosfaţilor plasmatici are drept consecinţă o scădere imediată a calcemiei.

Hipofosfatemia poate surveni în *hiperparatiroidism, rahitism, sindrom Fanconi*,

precum şi în cazul administrării parenterale de lichide lipsite de fosfaţi şi, în special, în urma perfuziei intravenoase de glucoză, în cantităţi mari.

Deficitul sever de fosfaţi duce la astenie musculară, parastezii, hiporeflexie, tremor, ataxie. În unele cazuri, celulele musculare sărăcite de compuşi macroergici pot ajunge la liza miofibrilelor, cu creşterea consecutivă în ser a CPK.

Deficitul de fosfaţi perturbează funcţia elementelor figurate sanguine: scade capacitatea fagocitară a leucocitelor, ce predispune la apariţia infecţiilor, este deficitară retracţia cheagului şi plachetele au o durată de viaţă scăzută; prezintă fragilitate crescută şi hematiile. Scăderea fosfaţilor din eritrocite diminuează generarea de 2,3 difosfo-glicerat, ce modifică curba de disociere a hemoglobinei, şi se ajunge la o hipoxie tisulară în prezenţa unei saturaţii cu oxigen relativ normală a sîngelui. Este evident că se înrăutăţeşte, în aşa caz, starea pacienţilor cu patologii cardiace, pulmonare, anemii.

Hiperfosfatemia se constată în hipoparatiroidism, insuficienţă renală, hipervitaminoza D, sarcoidoza.

Oligoelemente**. Fierul.* Cea mai mare parte a celor 4,5-5,0g fier din organismul unui adult se găseşte sub formă de hem. Se află în combinaţie cu diverse proteine, generînd *hemoproteinele* (hemoglobina, mioglobina şi heminele celulare-citocromii, peroxidazele, catalazele, xantin oxidaza, fenilalanin şi tirozin hidroxilaza). Aproximativ 25 % din totalul de fier se găseşte sub formă de ***feritină şi ***hemosiderină,*** şi numai cca 1% se află în plasmă şi în lichidul interstiţial, în formă de *transferină*.

Feritina prezintă un grup de proteine hidrosolubile, relativ termostabile, cu o greutate moleculară în jur de 460 kDa. Moleculele de feritină alcătuite din subunităţi au o formă de sferă goală, miezul fiind ocupat cu incluziuni de fier. Un astfel de complex poate fixa pîna la 4500 atomi de Fe, dar de regulă numai 20% din capacitatea de fixare a fierului este ocupată. În lipsa incluziunilor de fier se constată prezenţa *apoferitinei*. Dacă procentul de fier depăşeşte 37 (în unele cazuri chiar şi 50%) şi complexele Fe - proteină sunt incomplet invelite de subunităţile proteice, se condensează şi devin insolubile, se ajunge la *hemosiderină*. Preponderent, 70% din fierul depozitat se găseşte sub formă de feritină, şi restul de 30% e reprezentat de *hemosiderină*. Creşterea concentraţiei de hemosiderină denotă o suprasăturare cu fier a feritinei.

Conţinutul de feritină este reglabil – sinteza de apoferitină creşte în condiţiile unei încărcări cu fier şi scade în caz de carenţa lui. Dozarea feritinei serice, glicozilată şi lipsită de fier, poate stabili modificările în rezervele de fier. S-a constatat că 8-10 mg fier depozitat corespunde 1 μg feritină serică pe litru. Este concludent că în cazul unui deficit de fier, nivelul feritinei serice scade şi la o supraîncărcare cu fier concentraţia serică a ei va creşte evident. În condiţiile unei absorbţii optime cantitatea fierului absorbit din alimente nu depăşeşte 4 mg/zi. Durata vieţii unei molecule de feritină cu fier este de cîteva zile şi deci procesul de degradare şi sinteză contribuie ca rezervorul intracelular de fier să fie uşor supus mobilizării.

Gradul de absorbţie a fierului depinde de forma în care se administrează fierul din alimente. Se absoarbe mai greu fierul trivalent. În prezenţa vit. C şi în mediul acid fierul se reduce la forma fieroasă (bivalent) care este mai uşor absorbabilă. Se consideră că compuşii care formează complexe insolubile cu fierul, ca de exemplu fosfaţii din lactate

precum şi oxalaţii, acidul fitic din cereale îi reduc gradul de absorbţie.

Cuprul – un constituent esenţial în activitatea unor enzime ca: *citocromoxidaza, peroxidaza, monoaminoxidaza, superoxiddismutaza.*

S-a demonstrat ca cuprul din raţia alimentară este absorbit rapid, dar procesul poate fi dereglat (inhibat) de prezenţa în lumenul intestinal a sărurilor de molibden. În plasmă, cuprul se fixează labil de albuminele serice, fiind vehiculat la ţesuturi. După 24 ore toată cantitatea în plasmă se regăseşte la nivelul α_2 globinelor – *ceruloplasmina.* Atomii de Cu, fixaţi iniţial de albuminele serice labil, sunt captaţi în ficat, încorporaţi în ceruloplasmina sintetizată în acest organ, apoi reîntorşi în plasmă. Se consideră că ceruloplasmina nu este un adevărat transportator de Cu, şi metalul incorporat nu participă la schimburi cu ţesuturile, fiind scos din circuitul metabolic. Complexul Cu - ceruloplasmina este degradat în ficat, iar cuprul eliberat se elimină pe cale biliară.

Concentraţia cuprului seric oscilează între 90-140 µg/dL sau 14-22 µmol/L. Valori ridicate ale cuprului seric şi ale ceruloplasminei se întîlnesc în infecţii acute şi cronice, infarct miocardic, leucemii acute şi diverse procese neoplazice. Ceruloplasmina se comportă ca o proteină de fază acută, creşterea ei corelînd cu alţi indicatori de fază acută ca: fibrinogenul, proteina C. În stările menţionate, nivelul transferinei serice scade. Scăderi patologice ale cupremiei şi ceruloplasminei s-au descris în *sindromul nefrotic* sever, în enteropatii cu pierderi de proteine şi perturbarea gravă a sintezei hepatice de proteine.

Sugarii hrăniţi exclusiv cu lapte de vacă, un aliment deosebit de sarac în cupru, pot face o hipocupremie, anemie hipocromă microcitară, hipoproteinemie şi edeme. O situaţie mai gravă are loc la un deficit de cupru în *maladia Menkes* – defect genetic cu dereglarea proceselor de absorbţie şi utilizare a cuprului. Suferă copiii de sex masculin, boala e transmisă printr-un mecanism recesiv legat de cromozomul X. Se observă perturbări în dezvoltarea fizică şi intelectuală, crize convulsive şi un păr aspru, fără luciu, ţepos, friabil şi răsucit, care la palpare dă senzaţia de sîrmă de oţel (steely-hair sau kinky hair syndrome). Copilul este susceptibil la infecţii, hipotermie şi decesul survine pînă la vîrsta de 3 ani. Defectul de transport al cuprului prin celulele mucoasei intestinale survine şi la nivelul transportului transplacentar. Blocarea cuprului în mucoasa intestinală iar în cazul administrărilor intravenoase în ficat, se datorează unei proteine cu structură anormală care imobilizează metalul, făcîndu-l inaccesibil ţesuturilor. În consecinţă, se instalează deficite ale sistemelor enzimatice dependente de cupru, ce sunt responsabile de anomaliile somatice şi neurologice.

Zincul – element structural al carboxi-peptidazelor, alcool dehidrozenazei, carbanhidrazei. Conţine zinc şi insulina, leucocitele. Concentraţia plasmatică variază între 11-17,6 µmol/L. Aproximativ 30-40% din zincul seric este fixat de α_2 *macroglobulină,* iar restul este fixat labil de albumine.

Deficitul de zinc survine la un aport insuficient sau la pierderi exagerate urinare. În cazul unei depleţii acute apar: diareea, stări depresive, dermatita perinazală şi periorală, alopecia. Manifestările clinice dispar după cîteva zile de la începutul tratamentului cu zinc. Este descrisă o maladie cu caracter genetic, caracterizată prin dereglari severe ale absorbţiei zincului denumită *aerodermatita enteropatică.* Are un mecanism de transmitere

autosomal recesiv şi se exprimă prin diaree, alopeţie şi leziuni erozive în jurul orificiilor, precum şi cruste localizate pe coate, genunchi şi glezne. Se consideră ca subiecţii afectaţi de această maladie prezintă o anomalie în structura unei proteine secretate de pancreas, cu rol de fixare a zincului, facilitînd absorbţia. Laptele de mamă conţine o astfel de proteină, similară cu cea din pancreasul subiecţilor sănătoşi. Fenomenele respective apar după înţărcare şi trecerea la o alimentaţie cu lapte de vacă.

Manganul. In vitro activează fosfatazele, arginaza, carboxilazele şi cholinesteraza. Experimental a confirmat că locul cardinal unde este concentrat elementul este mitocondria, ceea ce evident presupune rolul manganului drept coenzimă în activitatea enzimelor lanţului respirator.

Cobaltul – element structural al vit. B_{12} – este implicat în activitatea enzimelor ce conţin B_{12} ca cofactor. Deficitul de cobalt afectează formarea sîngelui.

COMPONENTE ORGANICE

Substanţe azotate neproteice. Azotul neproteic. Se consideră că produşii finali sau intermediari ai metabolismului reprezintă substanţele azotate neproteice. În ansamblu, acesti compuşi alcătuiesc azotul neproteic ce cuprinde: uree (50%), aminoacizi (25%), acid uric (4%), creatină (5%), creatinină (2,5%), indican (0,5%), purine, bilirubină, polipeptide. Evaluarea azotului neproteic se face în filtratul obţinut după sedimentarea proteinelor.

Diferenţa între azotul neproteic şi azotul ureic constituie *azotul rezidual (restant)*. La un adult sănătos variaţiile în concentraţiile azotului neproteic sunt minime, dar dependente de cantitatea proteinelor ingerate. În unele procese patologice nivelul azotului neproteic creşte, ducînd la *azotemie*. Deosebim *azotemie de retenţie,* cauzată de micşorarea eliminării prin urină a produselor azotate, care poate fi de natură renală sau extrarenală. În azotemie de retenţie de origine renală majorarea azotului neproteic e cauzat primordial de creşterea conţinutului de uree (90%). Azotemia retenţională extrarenală apare în însuficienţa cardiovasculară, micşorarea tensiunii arteriale şi scăderea fluxului sanguin renal. *Azotemia extrarenală* poate fi cauzată şi de dereglări în eliminări de urina, după formarea ei. *Azotemia de producţie* se depistează la un flux majorat de compuşi azotaţi în sînge, ca consecinţă a lizei proteinelor tisulare în inflamaţii, arsuri, traume.

Ureea – produsul final al metabolismului proteic la speciile ureotelice. Se produce în ficat şi reprezintă unul din mecanismele principale de detoxifiere a amoniacului. Se atestă creşteri de uree în insuficienţa renală, tumori, iradieri, degradări excesive de proteine, sindroame cu dezechilibru hidroelectric, aport excesiv de proteine alimentare.

Acidul uric – produs final al catabolismului purinic, poate fi de provenienţă endo- şi exogenă. Fixat de proteine, are un maxim de solubilitate plasmatică la o concentraţie de 380 µmol/L. 99% de acid uric se găseşte sub formă de uraţi de sodiu. Se întîlnesc hiperuricemii primare şi secundare. Cele secundare se produc prin hiperproducţie de acid uric în leucoze, policitemie, cură de slăbire, plasmocitom. În insuficienţa renală sau catabolism purinic crescut, la utilizarea unor medicamente, de asemenea se depistează nivel majorat de acid uric. Hipouricemiile sunt mai rare.

Creatina are o concentraţie de 25-35 µmol/L, deţinătorul principal este eritrocitul.

Cel mai fix constituent azotat al sîngelui, neinfluențat de alimentație și corelat cu metabolismul muscular este *creatinină.*

Creatinina. Nivelul creatininei serice este un indicator sensibil al funcției renale și variază între 62-97 µmol/L la bărbați și 44-88 µmol/L la femei.

Aminoacizii. Nivelul de concentrație plasmatică exprimă echilibrul dintre aportul alimentar, utilizarea lor în biosinteza și degradarea lor. Variații patologice apar în erori înnăscute ale metabolismului, preponderent cu dereglări în transportul tubular. Deseori apar sindroame de mare severitate, asociate cu debilitate mintală și des incompatibile cu viața.

În suprimarea funcției detoxifiante a ficatului și creșterea putrefacției intestinale va crește concentrația *amoniacului* plasmatic, care normal se găsește în concentrații foarte mici (25 µmol/L). În cantitate mică, în plasmă, se găsesc și *polipeptidele* care provin de la degradarea incompletă a proteinelor. Va crește cantitatea lor după arsuri extinse. În concentrație mică, în plasmă se depistează și *bilirubina* (17 µmol/L), alcătuită din 80% bilirubina neconjugată, legată de proteine și fosfatide și cea directă, conjugată cu glucoronizii.

SUBSTANȚE ORGANICE NEAZOTATE

Glucoza. Valorile normale variază între 3,3-5,5 mmol/L și este rezultanta intervenirii unui complex de factori endocrino-enzimatici. Glucoza plasmatică provine din alimentație, glicogenoliză (ficat) și gluconeogeneză (ficat, rinichi). Variațiile patologice se manifestă preponderent în diabetul zaharat (valori mari), iar hipoglicemiile se pot întîlni în hiperinsulinism, tulburări de resorbție renală, afecțiuni ale ficatului, insuficiență suprarenală și altele. Sunt descrise mai multe metode de depistare, dar cea cu ortoluidină este internațional standardizată. În ultimul timp intră în practica de laborator și metodele enzimatice.

Dintre principalele *componente lipidice* ne referim la următorii constituenți: colesterol, trigliceride, acizii grași liberi, fosfatidele, acizii biliari. Ultimii se găsesc în ser la indivizii sănătoși , în concentrații mici. Creșterea concentrației acizilor biliari se produce în icterele obstructive și în cele hepatocelulare.

Dintre *acizii organici* este prezent în ser un important produs al glicolizei anaerobe – *acidul lactic*. E de origine eritrocitară sau musculară, organe unde este intensă glicoliza anaerobă. Sunt descrise valori mari în ser după efort fizic, în insuficiență cardiacă, în hepatopatii.

O concentrație mică o are și *acidul piruvic* – produs intermediar (0,14-2 µmol/L) al metabolismului. Crește vădit concentrația lui în deficiența de vit.B_1, în alcoolism și în efort fizic intensiv. În insuficiența renală apare în concentrații majore *acidul guanidino-succinic.*

Sunt prezenți în sînge, în concentrație mică, și *corpii cetonici* (100-600 µmol/L). Creșteri deosebite sunt depistate în diabet, inaniție și alte patologii.

ENZIMELE PLASMATICE

Din cele 2000 enzime atestate pînă în prezent, numai o mică parte se localizează în plasmă (sau ser) şi sunt depistate în mod clinic *prin intermediul* diagnosticului, pronosticului, stabilirii evoluţiei proceselor cronice şi, în consecinţă, orientarea terapeutică. Din cele 6 clase deocamdată sunt mai puţin interesante pentru practica medicală curentă izomerazele şi ligazele, dar şi acestea valorează pentru investigaţiile de patogenie la nivel molecular.

Enzimele plasmatice sunt de provenienţă celulară, fiind difuzate din ţesuturi în sînge. Mecanismul disenzimiei plasmatice, mecanism de traversare a enzimelor şi izoenzimelor tisulare în ser, este foarte complex, posibil fiind o rezultantă a interacţiunii mai multor factori, dintre care principalii sunt:

- amplificarea biosintezei enzimei determinată la nivelul controlului genetic, în transcripţie sau translaţie;
- majorarea numărului de celule capabile de sinteză intensivă;
- gradul de alterare a proceselor energetice şi, consecutiv, al permeabilităţii selective a membranelor;
- vascularizarea organului lezat;
- schimbarea profilului enzimatic al organului în dependenţă de boală.

Dacă demarează eliberarea enzimelor, apoi viteza de producere a lor în lichidul extracelular va depinde de :

- localizarea ultrastructurală diferită a enzimelor: cele citoplasmice fiind mai uşor antrenate în circulaţie decît desmoenzimele legate de membranele organitelor, ele se vor afirma la progresarea procesului patologic, la lezarea celulei;
- greutatea moleculară a enzimelor, dimensiunile moleculelor: cele mici difundează cu viteză mai mare decît celelalte şi se eliberează la etapele timpurii ale alterării; viteza lor de eliberare e invers proporţională cu masa moleculară;
- gradientul de concentraţie în membrana celulară ce determină forţa motrice a eliberării de enzime. De exemplu, în celulele ficatului concentraţia LDH e de 3000 ori mai mare decît nivelul enzimei extracelular; în eritrocite – numai de 200 ori; sorbitol DH = 50.000:1; alcool DH = 20.000:1; ASAT şi ALAT = 10.000:1; enzimele cu un gradient de concentraţie mare abandonează mai uşor celulele decît cele cu coeficient mai mic;
- timpul de înjumătăţire diferit al enzimelor plasmatice: LDH = 113 ore; ASAT = 17 ore şi ALAT = 47 ore;
- inactivarea neproporţională;
- eliminarea diferită destul de redusă prin bilă (fosfataza alcalină, 5'-nucleotidaza, ceruloplasmina) şi urină (cu masa moleculară mai mică decît 60.000 Da);
- suprapunerea modelelor enzimatice caracteristice diferitelor organe.

Clasificarea funcţională a enzimelor plasmatice

Enzimele din plasmă se clasează, din punct de vedere al provenienţei şi funcţiei, în următoarele categorii:

1) *enzime secretorii* cu rol activ în plasmă, produse în ficat. Aici se includ enzimele coagulării, lecitin-colesteraza, renina, ceruloplasmina, pseudocholinesteraza; nivelul lor scade o dată cu lezarea celulelor producătoare.

2) *enzime excreto-secretorii* provenite din glandele exocrine şi pancreas. Ele sunt excretate şi acţionează la nivelul tubului digestiv (amilaza, lipaza, tripsina), se elimină prin bilă – leucin aminopeptidaza, fosfataza alcalină – la lezarea celulelor de origine sau la prezenţa unui obstacol la nivelul căilor excretorii. De asemenea, vor fi prezente în sînge şi la sporirea permeabilităţii membranei celulelor secretorii.

3) *enzimele indicatorii celulare* predomină în plasmă, la lezarea celulei de origine. Ele au valoare de indicatori plasmatici ai sediului organului lezat intrastructural.

Localizarea leziunii nu e întîmplătoare şi poate fi stabilită prin urmatoarele modalităţi:

a) dozarea unei enzime specifice de organ;

b) determinarea şi caracterizarea izoenzimelor cu valoare organospecifică;

c) stabilizarea activităţii unor grupări (constelaţii) de enzime.

Lezarea principalelor organe ar trebui să se reflecte în plasmă. Reflectarea plasmatică a profilului de organ nu se observă totuşi în mod constant, deoarece se produce fenomenul de dispersie a profilului datorat complexităţii şi disproporţiei de contribuţie a factorilor menţionaţi. Dispersia enzimatică este mult mai puţin pronunţată după o afecţiune unică şi gravă (infarct miocardic vast), fapt care justifică utilitatea testelor, în special, în cazul acutizării maladiei. Agresiunile slabe şi repetate favorizează fenomenul de dispersie, şi indicii activităţii enzimatice nu mai corespund celor din celulele de origine.

Principalele enzime plasmatice cu valoare diagnostică

Ficat. Enzimele organospecifice sunt: histidaza, urocanaza, ceto-1-α-fosfat-aldolaza, sorbitol dehidrogenaza, ornitincarbamil-transferaza, arginaza.

Glutamat dehidrogenaza – enzimă mai puţin specifică – este caracteristică mitocondriilor hepatice, manifestată printr-un grad de activitate mai redus în miocard şi rinichi. E un indicator al afecţiunii mitocondriilor celulelor.

GOT-ASAT (aspartat aminotransferaza) reprezintă o enzimă biloculară (citozol şi mitocondrii), prezentă în toate celulele organelor şi, în special, în miocard, ficat, muşchi, rinichi.

GPT-ALAT (alanin aminotransferaza) se conţine în cantităţi mari în citoplasma hepatocitelor, se utilizează în diagnosticul precoce al formelor anicterice şi în depistarea perioadelor de evoluţie a hepatitelor cronice.

Lactat DH e prezentă în toate celulele organismului, constituind un tetramer alcătuit din două subunităţi peptidice – H şi M – asociate în cele 5 izoenzime proprii tuturor ţesuturilor.

Sporirea esenţială de LDH_1 şi LDH_2, cu prevalarea lui LDH_1, este caracteristică infarctului miocardic, iar respectiv a LDH_2 – anemiei megaloblastice. LDH_5 se depistează preponderent în necroza hepatică.

Testiculul postpubertin conţine o enzimă organospecifică LDHz, cu o mobilitate electroforetică între LDH_3 şi LDH_4.

Valorile *raportului Schmidt* (ASAT + ALAT/GDH) oferă date importante referitoare la pronosticul unei hepatopatii evolutive.

Leucin aminopeptidaza provine, preponderent, din celulele parenchimului hepatic, fiind caracteristică şi altor organe – pancreasului, rinichilor, intestinului, mucoasei.

Devierile patologice semnificative pentru diagnosticul diferențiat sunt extensiunile semnalate în icterele obstructive cauzate de obstacolul biliar.

Izocitrat dehidrogenaza totală sporește în cazul sindromului de citoliză hepatică.

Icterul obstructiv se caracterizează prin creșterea 5'-*nucleotidazei*, la fel prin intensificarea *fosfatazei alcaline*, care, la rîndul ei, sporește selectiv în afecțiunile osoase, cu orientare osteoblastică.

Miocard. Caracteristicile specifice în cazul afecțiunilor acestui țesut sunt: β-hidroxibutiratdehidrogenaza, LDH totală și, mai esențial, LDH_1 și LDH_2, cu predominarea primei izoenzime; ASAT – ca izoenzimă mitocondrială.

Creatinkinaza - CPK. Se află în trei forme izoenzimatice, localizată în citoplasmă și mitocondriile din miocard, mușchi și creier. Enzimele catalizează formarea de ATP din creatinfosfat și ADP în țesuturile menționate în urmatoarele forme: MM – în musculatura scheletică și miocard; BB – în creier, musculatura scheletică; MB – în miocard. Enzima serică se inactivează rapid prin oxidarea grupărilor SH ale situsului său catalitic.

La infarctul miocardic, o dată cu extinderea necrozei, proporțional crește valoarea CPK/MB. La miopatii se semnalează creșterea CPK, fără modificări ale activității izoenzimei MB.

Pentru infarctul miocardic acut sunt caracteristice valorile majorate ale *3-gliceraldehidfosfat dehidrogenazei, fosforilazei b.*

Creier. În afecțiunile lui se înregistrează valori semnificative ale activității *CPK totale și izoenzimei BB, acetilcholin esterazei, monoaminooxidazei*, valori majore ale *ASAT*, cu mult superioare celor din cadrul afecțiunilor altor organe.

Rinichi. Patologia lor este precedată de valori semnificative în activitatea *glicinamidino transferazei*, pe cînd în patologia pancreasului – în cantități mai mici.

Pentru diagnostic se utilizează frecvent și *izoenzimele alanin aminopeptidazei* cu următoarea caracteristică: AAP_1 (în ficat), AAP_2 (în pancreas) și AAP_3 (în rinichi). O semnificație aparte pentru diagnosticul afecțiunilor renale are *glutaminaza*.

Mușchii scheletici. Patologia lor e caracteristică prin sporirea ***CPK totală,*** a *izoenzimei MM*; de asemenea, prin activizarea *F-1,6-difosfat-aldolazei* și devierea modelului *izo-LDH_5 către LDH_1*.

Fosfataza alcalină este o enzimă compusă din trei forme izoenzimatice: hepatobiliară, osoasă și intestinală. În decursul sarcinii se mai adaugă o formă tranzitorie-placentară. Mobilitatea electroforetică diferă de forma moleculară. Ordinea descrescîndă a acestei valori de la anod către catod este următoarea: hepatică, osoasă, intestinală. Aceste izoforme se reglează diferit: fosfataza intestinală este inhibată de L-fenilalanină, L-tirozină, L-triptofan; cea placentară – numai de L-Phe.

Un interes deosebit prezintă *fosfataza acidă*, care se află în organe conform ordinii descreșterii valorii: prostată, oase, ficat etc. Amplificarea activității fosfatazei acide și, mai ales, a izoenzimei sale tartrico-sensibile, e înregistrată la carcinomul metastazat al prostatei.

Dintre izoenzime se mai utilizează frecvent și cele ale *α-amilazei,* avînd două izoenzime: forma *salivară și pancreatică;* ele se majorează respectiv la parotidite și la pancreatite acute. La cea din urmă patologie crește și lipaza pancreatică.

Poate fi explorată şi pseudocholin esteraza, care sporeşte la afecţiunile hepatice cronice evolutive, în special în ciroză, şi scade în intoxicaţii cu fosfor organic.

SISTEMELE TAMPON SANGUINE

În organismul uman reacţia mediului intern abia depăşeşte cadrul neutru: pH=7,35-7,45. Păstrarea acestei constante este hotărîtoare pentru desfăşurarea normală a tuturor proceselor vitale. Menţinerea pH-ului în limitele date o realizează următoarele mecanisme funcţionale:

1) eliminarea renală a acizilor şi bazelor;
2) eliminarea pulmonară a dioxidului de carbon;
3) neutralizarea acizilor şi bazelor de către sistemele tampon.

Un sistem tampon constă din amestecul a două substanţe tampon cu acţiuni complementare: una din ele se opune scăderii pH-ului determinată de acţiunea unui acid (la adaosul lui), iar cealaltă se opune creşterii lui determinată de adaosul unei baze. Aceste două substanţe din constituţia unui sistem tampon pot fi: un acid slab şi sarea sa alcalină sau o bază slabă şi sarea sa acidă. Indiferent de natura chimică, componenţa sistemului tampon care neutralizează acizii se numeşte *componentă bazică*, iar cea care neutralizează bazele este *componentă acidă*.

Cele mai importante sisteme tampon care funcţionează permanent în organismul uman sunt cele ale acidului carbonic - bicarbonat; al fosfaţilor, al proteinelor şi hemoglobinei.

I. Sistemul tampon acid carbonic-bicarbonat Cota lui e de 10% din total, constituind unul din sistemele ce se reglează fin. H_2CO_3 joacă rolul de donator de protoni, iar ionul bicarbonat HCO_3^- – de acceptor al protonului:



$$H_2CO_3 \rightleftharpoons H^+ + HCO_3^-$$

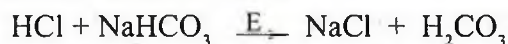
Bicarbonaţii din lichidul extracelular se prezintă sub forma de sare de Na - $NaHCO_3^-$, iar în celulă – $KHCO_3^-$, avînd anionul comun HCO_3^-.

Ecuaţia Henderson - Hasselbach:

$$pH = pK_{H_2CO_3} + \lg \frac{[HCO_3^-]}{[H_2CO_3]}$$

pK - constanta disociaţiei egală cu 6,1
$[HCO_3^-]$ - concentraţia ionilor
$[H_2CO_3]$ - concentraţia moleculelor nedisociate

În activitatea metabolică majoritatea acizilor formaţi sunt mai tari decît acidul carbonic. Pentru neutralizarea lor intervine componenta bazică a sistemului $NaHCO_3$ şi are loc reacţia de tipul:



$$HCl + NaHCO_3 \xrightarrow{E} NaCl + H_2CO_3$$

Anhidraza carbonică scindează acidul în $H_2O + CO_2$, la care dioxidul de carbon se elimină prin plămîni.

O bază tare generată, neutralizată fiind de componenta acidă a sistemului H_2CO_3, se va transforma în bicarbonat:



$$NaOH + H_2CO_3 \longrightarrow NaHCO_3 + H_2O$$

CO_2 sub formă de H_2CO_3 este permanent disponibil pentru tamponarea bazelor şi CO_2 reprezintă un produs încontinuu, constituind ultimul metabolit al majorităţii substanţelor transformate în organism.

În mod normal, la pH = 7,4 în plasmă şi în lichidul extracelular raportul bicarbonat acid este de 20/1. Funcţionarea acestui sistem tampon se combină cu cea a sistemului hemoglobinei.

La o *hipoventilaţie* pulmonară are loc scăderea difuziei CO_2 din sînge spre alveolele pulmonare, deci o mărire parţială a tensiunii acestui gaz în plasma sanguină. În ultima instanţă, sporeşte aciditatea sîngelui. La o *hiperventilaţie* fenomenele decurg invers.

II. Sistemul tampon al fosfaţilor

$$pH = pK_{H_2PO_4^-} + \lg\frac{[HPO_4^{2-}]}{[H_2PO_4^-]}$$

$[HPO_4^{2-}]$ - concentraţia ionilor Na_2HPO_4
$[H_2PO_4^-]$ - concentraţia ionilor NaH_2PO_4
pK - constanta disociaţiei egală cu 6,87

La valoarea pH = 7,4, valoarea raportului dintre ingredienţi constituie 5:1, ceea ce înseamnă că concentraţia formei acide e de 5 ori mai mică, fapt ce denotă o bună capacitate de tamponare pentru cantităţi suplimentare de acid.

Procesul tamponării are loc potrivit reacţiilor:



$$HCl + Na_2HPO_4 \longrightarrow NaCl + NaH_2PO_4$$
$$NaOH + NaH_2PO_4 \longrightarrow Na_2HPO_4 + H_2O$$

Acest sistem este operant, în special, în hematii şi în celulele tubulilor renali. Atare sistem de tampon are un rol deosebit în ţesuturi, cota fiind de 1% din întregul sistem. Capacitatea sistemului în sînge e maximă – la pH = 7,2.

III. Sistemul tampon al proteinelor predomină în celulele ţesuturilor, dar operează şi în plasmă. În constituţia lui intră proteinele care funcţionează ca anioni la pH-ul slab alcalin al mediului intern (+). În combinaţie cu ionii H^+ anionii proteici constituie componenta acidă a sistemului (H-proteina) şi tamponează bazele:



$$NaOH + \text{H-proteină} \longrightarrow H_2O + \text{Na-proteină}$$

Anionii proteici, în combinaţie cu cationii metalelor alcaline (Na, K), formează componenta bazică şi tamponează acizii:



$$HCl + \text{Na-proteină} \longrightarrow NaCl + \text{H - proteină}.$$

Şi în acest caz, datorită tamponării, acizii şi bazele se transformă în produşi neutri (NaCl şi H_2O), iar componentele sistemului se transformă una în cealaltă, manifestînd aciditate sau bazicitate moderată, la care pH-ul mediului nu se afectează.

IV. Sistemul tampon al hemoglobinei la fel conține componentă proteică cu o capacitate mare – cota de 75% din total.

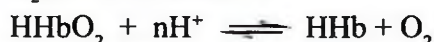
Participarea hemoglobinei în reglarea pH e însoțită de transportul O_2 și CO_2. Constanta disociației grupelor acide ale Hb este în dependență de saturarea cu O_2.

Hb intră în componența a 2 sisteme tampon:

a) HHb (hemoglobină acidă) - KHb (hemoglobinat de potasiu);

b) $HHbO_2$ (oxihem. acidă) - $KHbO_2$ (oxihemoglobinat de potasiu).

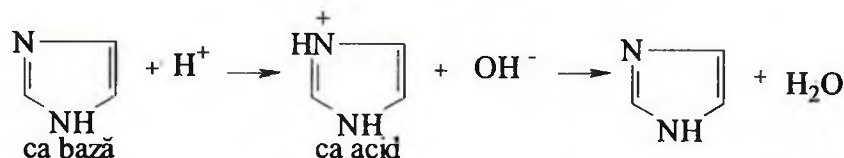
Oxihemoglobina este un acid mai puternic (pK = 7,16) decît dezoxihemoglobina (pK = 7,71) și cedează O_2, conform ecuației:



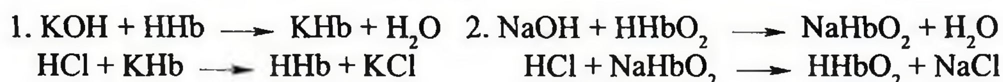
$$HHbO_2 + nH^+ \rightleftharpoons HHb + O_2$$

Ambele sisteme își pot exercita acțiunea tampon datorită hemoglobinei care include în partea sa proteică multe resturi de histidină.

Inelul imidazolic posedă capacitatea de a accepta și totodată de a ceda H^+ unuia dintre atomii de azot ai heterociclului.



Reacțiile respective ale acestui sistem tampon sunt:



1. $KOH + HHb \rightarrow KHb + H_2O$
   $HCl + KHb \rightarrow HHb + KCl$

2. $NaOH + HHbO_2 \rightarrow NaHbO_2 + H_2O$
   $HCl + NaHbO_2 \rightarrow HHbO_2 + NaCl$

Acidul și baza se transformă în produși neutri, păstrînd aciditatea sau bazicitatea lor moderată, fără a afecta pH-ul mediului.

Anomaliile echilibrului acido-bazic sunt asoțite de apariția acidozelor și alcalozelor (metabolice și respiratorii). Deoarece, în evoluția proceselor metabolice se generează ioni de hidrogen (H^+) și nu ioni de hidroxil (OH^-), tendința spre acidoză se întîlnește mult mai frecvent decît tendința la alcaloză. Mecanismele homeostatice sunt adaptate, în special, pentru contracararea unui exces de H^+ și din acest motiv, relativ mai rar, alcalozele (metabolice) se compensează cu dificultate. E concludent, că la procesele complexe de menținere a echilibrului acido-bazic contribuie toate celulele organismului, un rol premordial revenind hematiilor, plămînilor și rinichilor.

HEMOSTAZA ŞI FIBRINOLIZA

Echilibrul fluido-coagulant constituie un sistem de mecanisme antagoniste şi interdependente, factor hotărîtor al conservării potenţialului hemostatic al sîngelui, precum şi al fluidităţii acestuia. Sunt procese reglate enzimatic, tulburarea şi dezechilibrul cărora cauzează formarea de trombe (cheaguri) sau sîngerarea.

Coagularea

Particularităţile caracteristice acestui proces sunt:

1) numărul mare de activatori şi inhibitori care intervin;

2) existenţa majorităţii factorilor coagulanţi, ca precursori;

3) preponderent, drept factori coagulanţi servesc proteazele ce se produc la proteoliza limitată din formele lor inactive;

4) transformarea lor din forme inactive în active are loc prin autocataliza determinată de propriile lor produse;

5) unii factori, ca de exemplu Ca^{++}, au acţiune multiplă, intervenind pe parcursul timpului de coagulare;

6) procesul complex decurge "în cascadă"; faza latentă este formată de avalanşa transformărilor accelerate ale factorilor coagulării prin forme inactive şi active.

În desfăşurarea procesului coagulării se disting faze care, în ordinea manifestării lor succesive, se eşaloneaza în *doi timpi,* şi anume:

a) *timpul parietal* este determinat de vasoconstricţia vaselor mici, capilarelor din ţesutul afectat de serotonină, catecolamine şi obturarea lor prin agregate trombocitare. La interacţiunea fibrelor de colagen ale vasului lezat cu trombocite, prin forţe electrostatice, are loc agregarea lor. Trombocitele agregate suferă metamorfoză vîscoasă şi, în consecinţă, elimină astfel de compuşi ca: serotonina, catecolaminele, fosfolipidele şi îndeosebi ATP, ADP, ultimul amplificînd agregarea trombocitelor şi accelerînd obturarea vaselor lezate. Această agregare are un caracter reversibil.

b) *timpul plasmatic* reprezintă o agregare ireversibilă a trombocitelor asigurată de acţiunea trombinei, ce duce la formarea cheagului rezistent.

Procesul autocatalitic, la etapele iniţiale, necesită cantităţi minime de factori şi decurge în patru etape succesive: producerea protrombinazei, generarea trombinei, transformarea fibrinogenului în fibrină, cu stabilizarea acestuia, sinereza şi retracţia cheagului.

Ultimul timp al procesului, care se produce în homeostazia hemostazei, e fibrinoliza.

În anul 1863, Djozef Lister a observat că în vena jugulară izolată sîngele boului rămîne lichid, pe cînd separat în vasul de sticlă – se coagulează. S-a constatat că acest contact cu obiect artificial duce la formarea unor componente proprii sîngelui. Acest mecanism de coagulare a fost numit *intrinsec.*

La adăugarea în plasma sanguină a unor componente, coagularea de asemenea are loc. Acest mecanism a fost numit *extrinsec.* La coagulare, ambele mecanisme activează concomitent. Ele se deosebesc numai la etapele iniţiale.

Caracteristicile principalilor factori ai coagulării

Factorul I – fibrinogenul – prezintă o glicoproteină care se sintetizează în ficat, are aproximativ o masă moleculară egala cu 340 kDa şi o formă moleculară alungită. Fibrinogenul e alcătuit din 6 lanţuri polipeptidice, grupate cîte 2 (α, β, γ), cu o mobilitate electroforetică β–γ. Joncţiunea lanţurilor glucidice cu cele peptidice se realizează printr-o legatură glucozil-aminil-arginină. Oxidarea glucidelor din fibrinogen îi conferă inconsistenţă faţă de fenomenul coagulării. Transformarea în fibrină se poate realiza atît artificial, cît şi fiziologic.

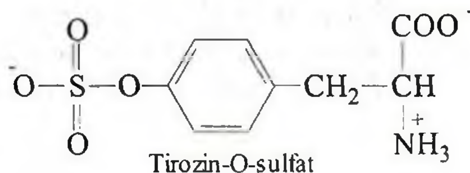
Artificial, fenomenul e provocat de acţiunea unor factori chimici ca: ninhidrina, aloxanul, cloramina; factori biologici: veninul de şarpe, stafilocoagulaza, enzimele proteolitice.

Fiziologic, în 2-3 secunde, sub acţiunea trombinei – o protează de tipul tripsinei, ce scindează 4 legături peptidice între arginină şi glicină, cu eliberarea a 4 peptide – 2A din α lanţuri constituite din cîte 18 resturi aminoacidice şi 2B din β – cîte 20 fiecare, denumite *fibrinopeptide*. Lanţurile γ cu tirozina terminală nu sunt antrenate în fenomenul de conversiune a fibrinogenului în fibrină.

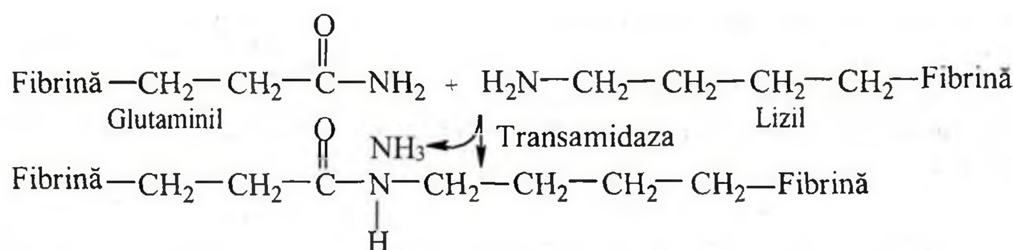
Cu pierderea fibrinopeptidelor, se creează condiţii favorabile pentru asocierea spontană a monomerilor sub formă de polimeri intermediari, cu legături de tip necovalent, realizate prin interacţiuni hidrofobe şi punţi de H. Complexul este solubil, dar puţin stabil. Polimerizarea monomerilor se realizează longitudinal şi transversal şi duce la o gelificare, cu trasformarea din stare de sol în cea de gel, rezultînd un cheag amorf, slab.

La acţiunea unui factor stabilizant (F.XIII) – o fibrinază activată prin trombină, se formează o fibrină insolubilă, care conferă cheagului rigiditate; se stabilesc legături covalente peptidice între grupările α-amino din resturile de lizină şi carboxil ale glutaminei (enzima e o transamidază). *Factorul de stabilizare a fibrinei* (FSF, F.XIII) este o glicoproteină tetrameră cu masa moleculară de 340 kDa, formată din cîte o pereche de peptide identice, ***a*** (75 kDa) şi ***b*** (80 kDa). Centrul activ e localizat în lanţurile ***a***. F.XIII, se formează în hepatocite; în plasmă se găseşte sub formă inactivă, într-o concentraţie de 0,02 g/L. FSF inactiv se fixează pe suprafaţa coloanelor de fibrină şi se activează pe loc prin proteoliză de către trombină, în prezenţa ionilor de Ca^{2+}, prin scindarea unei legături între arginină şi glicină în lanţurile ***a***, în urma căreia se eliberează de la porţiunea N-terminală un peptid blocant, cu masa moleculară de 4 kDa. F.XIII activat se consumă rapid astfel încît în unele cazuri de tromboze venoase extinse cantitatea lui poate să scadă considerabil. FSF acţionează în două faze, în prezenţa ionilor de calciu. La deficienţa enzimei, la bolnavi apare o hemofilie (sîngerare). Care-i cauza diferitelor solubilităţi ale fibrinogenului şi monomerului de fibrină?

E stabilit că toate fibrino-peptidele detaşate au sarcină electrică negativă (acid glutamic şi aspartic, tirozin-O-sulfat), care provoacă respingerea reciprocă a moleculelor de fibrinogen. Monomerii de fibrină eliberaţi au o suprafaţa cu proprietăţi electrice deosebite şi capacitate de agregare.



Tirozin-O-sulfat



Microscopia electronică şi difracţia razelor X au demonstrat că fibrina posedă o structură periodică, cu lungimea segmentului repetată de 230 Å, pe cînd lungimea fibrinogenului e de 460Å. Monomerul fibrinei formează fascicule paralele, striate transversal, cu o periodicitate medie de 230 Å (fig.8.6, 8.7). Concentraţia fibrinogenului plasmatic e între 200-400 mg% (2-4 g/L).

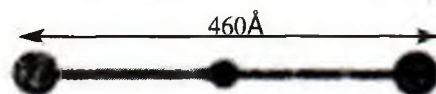


Figura 8.6. ***Reprezentarea schematică a moleculei de fibrinogen***

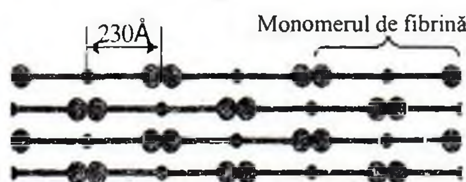


Figura 8.7. ***Asamblarea monomerilor de fibrină***

Factorul II– protrombina – proendopeptidază, o glicoproteină cu mobilitatea α_2-globină, cu o masă moleculară aproximativ egală cu 63 kDa şi punct izoelectric aproape de 5. Se sintetizează în ficat şi procesul necesită vitamina K, favorizînd realizarea carboxilării de către un sistem de enzime dependente de vitamina K. Procesului de carboxilare îi sunt supuse primele 10 resturi de acid glutamic de la capătul N-terminal al protrombinei. Fiind transformaţi în γ-carboxiglutamat, aceste resturi de aminoacizi sunt capabile să fixeze ionii de Ca^{++} (fig.8.8).

Antagoniştii vitaminei K – *dicumarolul* şi derivaţii lui, la fel ca şi *varfarina* (otravă pentru şobolani), provoacă hemoragii şi sunt substanţe anticoagulante.

Legînd Ca^{2+}, protrombina se ancorează cu fosfolipidele membranare ale trombocitelor acumulate în regiunea afectată. Acest fragment se detaşează, eliminînd *trombina*, ca rezultat al scindării proteolitice a legăturii arginină-treonină de la capatul N-terminal, apoi a legăturii arginină-leucină. Masa moleculară a trombinei e de 33,7 kDa. Trombina liberă e capabilă să activeze fibrinogenul plasmei (fig.8.9).

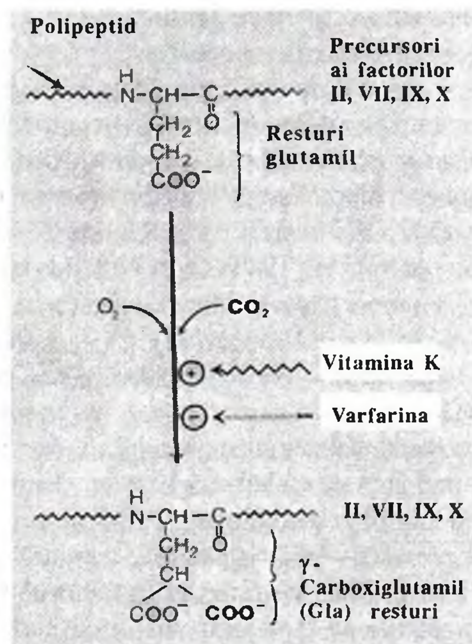


Figura 8.8. ***Carboxilarea resturilor glutamil***

Etapa de activare a F.X (*Stuart-Prower*)

reprezintă contopirea mecanismelor de coagulare a sîngelui. Ambele mecanisme, în consecinţă, provoacă apariţia factorilor proteolitici, ce activeaza F.X, cu formarea trombinei.

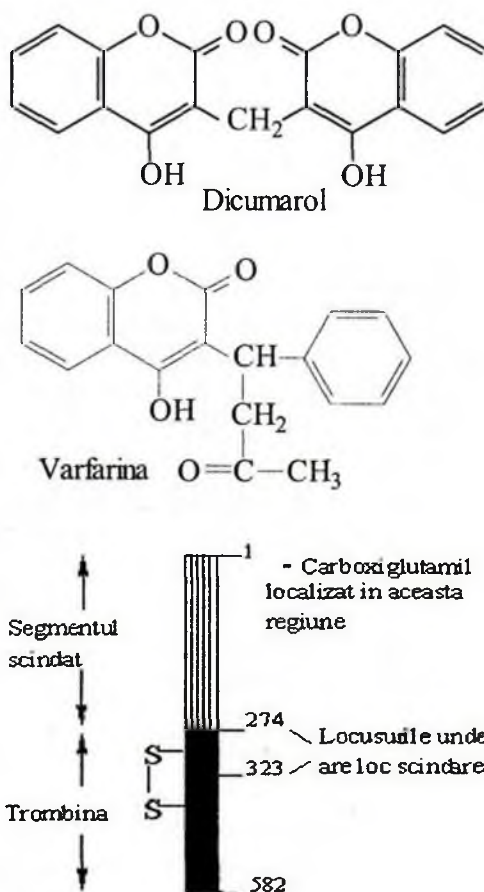


Figura 8.9. ***Structura protrombinei α şi β catene în trombină, unite prin legătură disulfidică***

Factorul F.V, F.VI – proaccelerina, accelerina – este o proteină macromoleculară (350 kDa) produsă de macrofage, prezentă în cantităţi mici (0,01g/L) în formă inactivă în plasmă. Din cauza labilităţii se degradează rapid şi nu mai poate fi pusă în evidenţă nici în ser, nici în plasma veche. Ea se consumă în decursul coagulării. Nu are proprietăţi enzimatice, dar este un component al sistemului de activare a protrombinei. Lipsa congenitală rară a F.V se transmite autozomal recesiv.

Factorul VII – proconvertina – e o globulină cu masa moleculară 15-25 kDa, are o concentraţie de 10-15 mg/L, se sintetizează în ficat, cu participarea vitaminei K.

Factorul VIII – globulina antihemolitică, GAH – este o β-macroglobulină, cu masa moleculară de 2 milioane Da, prezentă în plasmă în concentraţie de 0,005 g/L şi avînd timpul de înjumătăţire de o jumătate de zi. Se formează în hepatocite. Este un factor labil şi se consumă în decursul coagulării. Este alcătuit din trei componente distincte: $F.VIII_{coag}$ reprezintă cofactorul activării F.X în prezenţa accelerinei (F.VI) ; $F.VIII_{agn}$, purtătorul determinanţilor antigenici proprii; F.VIIIvW (von Willebrand), cofactorul manifestării funcţiilor hemostatice plachetare. Lipsa ereditară a acestui component duce la manifestarea angiohemofiliei (*maladia von Willebrand*).

Factorul X (*Stuart-Prower*) este o proteină cu masă moleculară relativ redusă (56 kDa) produsă în ficat şi prezentă în plasmă într-o concentraţie de 1,003 g/L. Este o substanţă stabilă care nu se consumă în cursul coagulării, formată din două lanţuri peptidice (unul greu şi celălalt uşor) cuplate disulfidic între ele. F.IXa eliberează, prin proteoliză, din lanţul greu al moleculei F.X un fragment peptidic mic. Prin aceasta se descoperă centrul activ situat în partea C-terminală a moleculei, prin care enzima devine şi ea activă (F.Xa). Este de remarcat că factorul Stuart-Prower poate fi activat nu numai prin mecanismul fiziologic sus - nominalizat ci, în condiţii patologice, şi de către alte serinproteaze eliberate şi activate în cursul diferitelor reacţii inflamatorii.

Proprietățile structurale și funcționale ale factorilor sistemului de contact

În plasma sanguină sunt prezenți doi kininogeni: *macro (HMWK) - și microkininogeni (LMWK)*. Sinteza lor este codificată de gena localizată în cromozomul 3. Gena respectivă conține 11 exoni și 9 din ei formează trei exoni tripleți, fiecare din ei avînd originea în paternul genei cistationinei. Exonul 10 conține o secvență comună pentru ambii kininogeni (10a) și o secvență unică C-terminală pentru HMWK (10b). Exonul 11 codifică secvența unică C-terminală a kininogenului micromolecular (LMWK).

Splaisingul alternativ al transcripției primare a genei kininogenului formează două mRNA diferite, specifice pentru fiecare formă. Kininogenii sunt glicoproteine polifuncționale, moleculele cărora sunt prezentate printr-un lanț polipeptidic, sintetizate în hepatocite, apoi glicozilate înainte de a fi secretate.

Kininogenul macromolecular (factorul Fitzgerald, HMWK). Molecula de HMWK conține 626 resturi aminoacidice cu masa moleculară de 120 kDa și pI egal cu 4,3. Concentrația plasmatică este de 65-130 μg/mL.

HMWK poate reversibil să se fixeze de trombocite, neutrofile, celule endoteliale, procesul necesitînd ioni de Zn^{2+}. Fixarea se realizează prin glicoproteine identice cu receptorii ce fixează componenta C1q a complementului. La fixarea cu celulele endoteliale se majorează viteza de eliminare a bradikininei, care stimulează generarea de NO și a prostaciclinei, în consecință, cu efect antitrombotic și vasodilatator. Domeniul terminal al HMWK posedă centre de fixare a prekalicreinei și a factorului XI al coagulării.

HMWK inhibă activitatea proteinazelor cisteinice, preîntîmpină degradarea proteinelor plasmatice la lezarea țesuturilor.

Kininogenul cu masă moleculară redusă de 80 kDa (LMWK, factorul Flaujeac) reprezintă restul rămas în urma scindării proteolitice a HMWK. Are o concentrație de 0,05 g/L în plasmă și timpul de înjumătățire de 30 zile. Secvența aminoacidică a bradikininei este prezentă și în molecula de LMWK, ca urmare, acest peptid purtător de semnale poate fi eliberat și din această proteină prin proteoliză.

Prekalicreina (PKAL, factorul Fletcher) și kalicreina (KAL) plasmei sanguine.

Prekalicreina este o glicoproteină ce conține 619 aminoacizi, avînd o concentrație plasmatică de 295-580nmol (35-50 μg/mL). Se sintetizează în hepatocite și gena respectivă e compusă din 15 exoni și 14 introni, localizată în partea distală a cromozomului 4. Se activează PKAL la liza legăturii peptidice Arg 371 de formele active (α și β) ale factorului XII, cu formarea lanțurilor ușor și greu ale *kalicreinei*. Lanțul polipeptidic greu (4 domenii repetate, omoloage F.XI) participă la fixarea HMWK, F.XII și a neutrofilelor. Kalicreina formată posedă un spectru larg de funcții biologice; hidrolizînd două legături peptidice în HMWK duce la generarea bradikininei.

Factorul XII (factorul Hageman) este sintetizat de hepatocite ca o glicoproteină cu masa moleculară de 78 kDa, ce conține 596 resturi de aminoacizi și 7% glucide. mRNA respectivă are o lungime de 2,8 kilobaze. Activarea are loc sub acțiunea kalicreinei amplificată de prezența HMWK. Consecutiv, se formează două forme active α și β legate prin legătură disulfidică. Lanțul greu e responsabil de fixarea proteinei de suprafața anionică, la activarea prin contact. Forma ușoară (β) este un activator efectiv al PKAL, iar α F.XIIa – al F.XI.

Factorul XI (PTA, factorul Rosenthal) este sintetizat în ficat, conține 5% glucide, are o masă moleculară de 143 kDa și este secretat în plasmă în formă de zimogen în concentrație de 30 nmol. Circulă acest factor în complex cu HMWK. Factorul PTA este o proteinază serinică deosebită – molecula conține lanțuri polipeptidice identice fixate prin legături disulfidice și două centre active la un mol de enzimă. Activarea factorului XI are loc sub influența factorului XIIa, în prezența HMWK.

Proteinele sistemului de contact nu sunt elemente fundamentale ale procesului de hemostază, dar joacă un rol auxiliar în generarea trombinei.

Mecanismul coagulării. *Calea extrinsecă* e de durată scurtă – de secunde. Factorul de declanșare îl constituie sucul celular eliminat la lezarea țesutului – factor tisular de natură lipoproteică - fosfolipid (tromboplastină tisulară). *Calea intrinsecă* e de durată ceva mai lungă – de minute, intervenind mai mulți factori sanguini.

Căile extrinsecă și intrinsecă sunt determinate de sursa de fosfolipide. Ambele căi se finalizează cu formarea tromboplastinei active (f. Xa), ca rezultat al metamorfozei vîscoase a plachetelor și eliberarea factorilor plachetari. Procesul se realizează în 2 faze – prima reversibilă, iar cea de-a II-a este ireversibilă.

În decursul *primei faze* a acivării plachetare se eliberează conținutul granulelor dense. Procesul este reversibil în sensul că în lipsa unei amplificări poate să se stingă. În mecanismul intrinsec cei mai puternici activatori ai metamorfozei vîscoase sunt tromboxanii, grație activării primare a fosfolipazei A. În cel extrinsec are loc activarea receptorilor membranari fie printr-un contact cu fibrele de colagen, fie cu mediatorii de tipul: catecolaminelor, endotoxinelor, ADP, proteazelor. Transmiterea intracelulară a semnalului recepționat are loc prin intermediul mesagerilor secunzi, ca AMPc, DAG, IP_3, NO sau prin intermediul proteinkinazelor (fig.8.10).

Faza a doua a activării este caracterizată prin eliminarea conținutului de Ca^{++} al granulelor și în prezența adezinelor (fibrinogen, fibrinonectină) plachetele prezentînd metamorfoza vîscoasă, aderă între ele cu formarea *cheagului alb* – o stopare a leziunii microvasculare. Serotonina eliberată din plachetele agregate, prin efectele ei vasoconstrictoare, reduce fluxul sanguin spre zona lezată.

Mecanismul complex al hemostazei funcționează în organism ca un tot unitar, dar din punct de vedere sistemic coagularea sîngelui se împarte în 5 faze succesive:

prefaza: formarea tromboplastinei plasmatice prin orice cale;
faza I: transformarea protrombinei în trombină activă;
faza II: transformarea fibrinogenului solubil în fibrină insolubilă – coagularea;
faza III: fibrinoliza (uneori și fibrinogenoliza);
faza IV: retracția cheagului.

Interacțiunea dintre factorii sistemului de coagulare a sîngelui se prezintă în formă de trei complexe fermento-cofactoriale ce asigură coagularea în condiții fiziologice (fig.8.11).

Primul complex – VIIa + FT (factor tisular) – inițiază activarea factorilor IX și X. Complexul nativ VII-FT este fiziologic inert și devine activ la acțiunea factorilor IXa și Xa, în cantități minime ce scindează o legătură peptidică în molecula factorului VII. Fixarea factorului VII de cofactorul (FT) favorizează activarea efectivă a substraturilor respective.

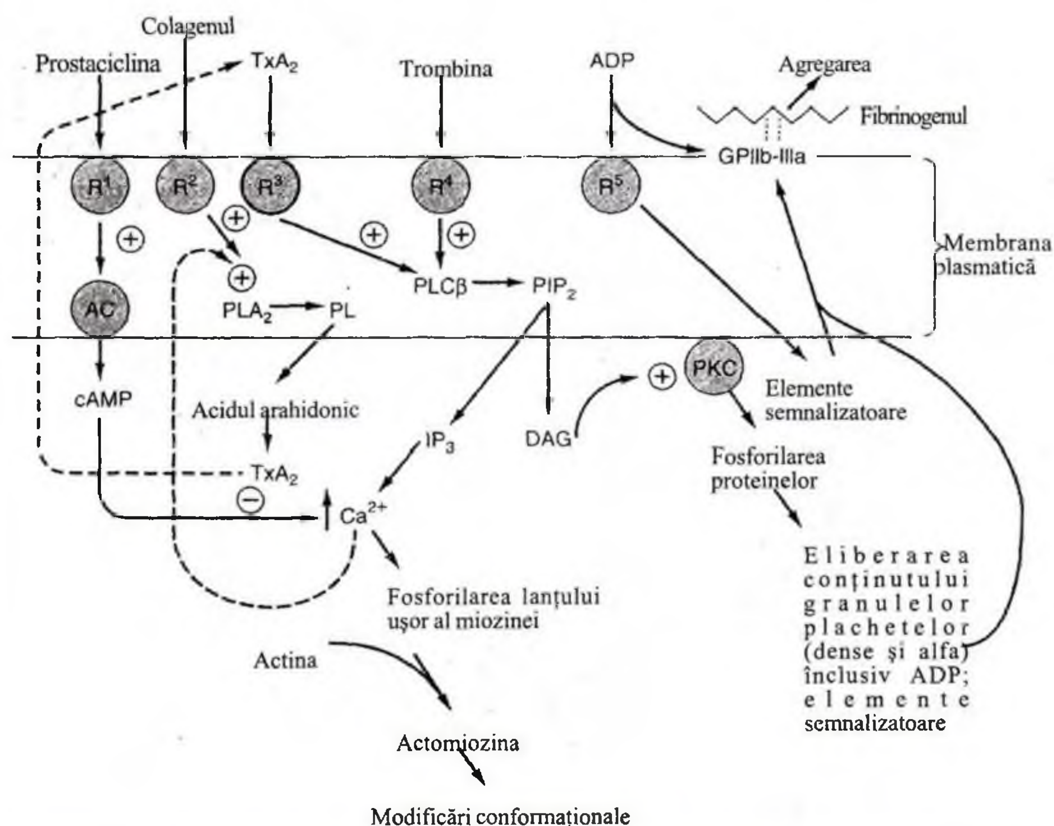


Figura 8.10. *Activarea plachetelor (schematic). Mediul extern, membrana plasmatică și partea internă a unei plachete sunt reprezentate de sus în jos. Trombina și colagenul sunt cei mai importanți activatori ai plachetelor. ADP este considerat un agonist slab; el cauzează agregarea, dar nu eliberarea granulelor (GP glicoproteină, R^1-R^5- diverși receptori, AC - adenilatciclaza, PL - fosfolipide, PLA_2- fosfolipaza A2; PLCβ - fosfolipaza Cβ, PIP_2 - fosfatidilinozitol-4,5-bifosfat, cAMP - AMPciclic, PKC - proteinkinaza C, TxA_2 - tromboxan, IP_3 - inozitol-1,4,5 - trifosfat, DAG -1,2 diacilglicerol, proteinele G implicate nu sunt arătate).*

Complexul colaborează la calea extrinsecă, fiindu-i caracteristică posibilitatea de a se inhiba numai după inițierea procesului coagulării.

Al doilea complex fermento-cofactorial (IXa - VIIIa - FL membranare) activează factorul X. Activarea factorului IXa (calea intrinsecă) este cauzată de factorul XIa – rezultat al interacțiunii factorilor participanți la activarea prin contact (XII, prekalicreina, kalicreina, kininogenul cu masă moleculară mare).

Al treilea complex fermento-cofactorial (Xa -Va - fosfolipidele membranare) transformă infinit protrombina în trombină.

Ambele căi sunt convertite la această etapă. *Antitrombina* și *proteina C* sunt inhibitori efectivi ai complexelor 2 și 3, pînă la formarea lor. Inhibitori sunt absolut necesari în procesul reglării sistemului de coagulare a sîngelui, pe cînd deficitul lor are consecințe letale. Antitrombina inhibă factorii Xa și IXa. *Proteina C* activă, cu participarea *proteinei S* (cofactor), inhibă factorii Va și VIIIa activați de trombină.

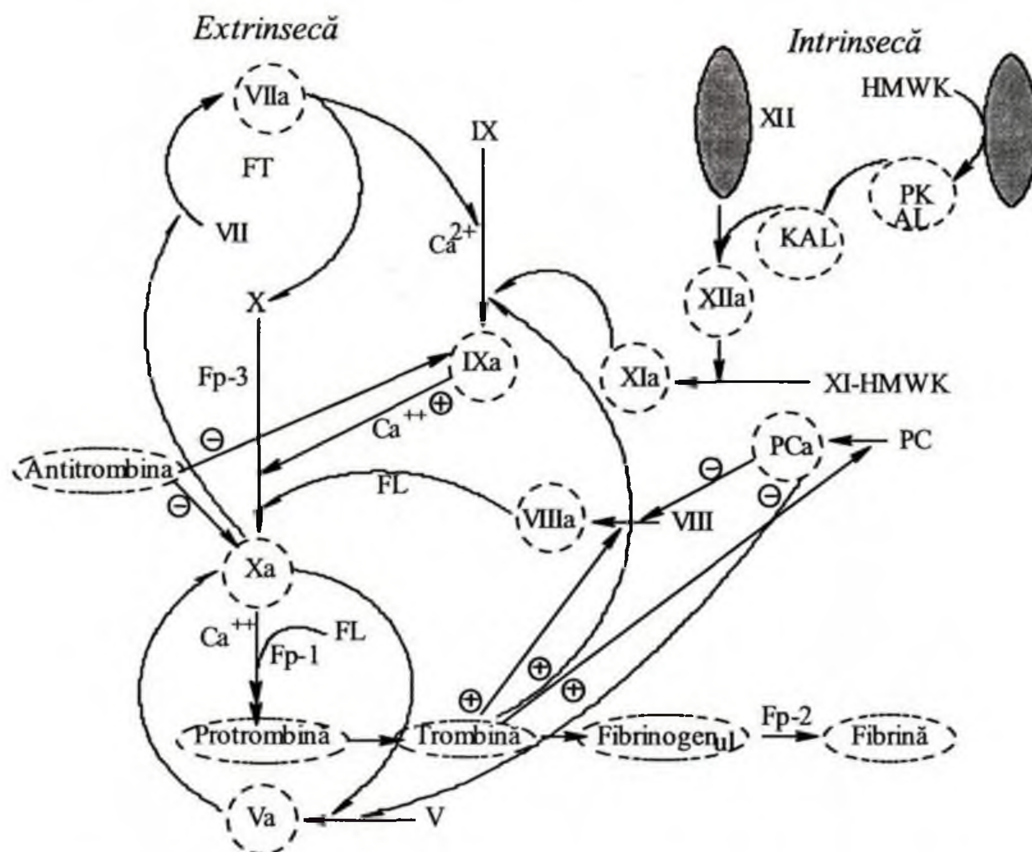


Figura 8.11. ***Schematic, e redat procesul de coagulare a sîngelui***

Ce reprezintă factorul IX (Christmas-Eve factor)?

O catenă glicoproteică cu masa moleculară egală cu 58,7 kDa şi conţinînd 17% de glucide. E vădită omologia dintre consecutivitatea aminoacidică la capetele N ale factorilor IX, II, X la om. Concentraţia în plasmă constituie 3 mg/L. Azi e bine cunoscută şi structura domenică a F.IX. El, ca şi factorii II, VII, X, proteinele C şi S, formează grupa proteinelor dependente de vitamina K. Capătul N terminal, numit Gla-domen, conţine resturi de γ-carboxiglutamat. Proteina se sintetizează în ficat şi pînă la secreţie este modificată posttranslaţional – are loc β-hidroxilarea Asp, de rînd cu cele 12-γ-carboxilări ale acidului glutamic, glicozilarea în ambele domenii (N şi C terminale).

Ataşarea ionilor de Ca^{2+} la domenul Gla modifică conformaţia factorului, devenind biologic activ. Alte locusuri sunt necesare pentru interacţiunea cu suprafeţele celulare. Domenul C terminal conţine o triadă de aminoacizi ai centrului activ, interacţionînd cu F.VIII.

Sunt studiate mecanismele de activare a F.IX de către F.XIa la nivel molecular: primar, se scindează legătura peptidică Arg-Ala interioară, cu formarea unui produs intermediar neactiv cu aceeaşi masă moleculară. La faza următoare are loc scindarea legăturii Arg-Val, cu eliminarea unui peptid compus din 35 aminoacizi, cu masa moleculară egală cu

9000 Da de la catena grea, acesta conținînd 50% de glucide ale moleculei primare, cu formarea factorului IXa. El conține o catenă ușoară (1-145 aminoacizi cu masa moleculară de16600 Da), legată prin leg. disulfidică cu catena grea (145-415 aminoacizi și o masă moleculară egală cu 27000 Da). Caracteristică este necesitatea de ioni de Ca^{2+}, care sunt fixați numai de către F.XI. Factorul IXa rămîne fixat de centrul activ al F.XIa, ce preîntîmpină activarea ulterioară. Fosfolipidele (FL) concurează cu F.XIa pentru F.IXa, ambele psedînd capacitatea de a lega fosfolipide. Astfel de mecanism previne formarea și eliberarea cantităților considerabile de F.IXa, pînă la aplicarea necesității de activare continuă a sistemului coagulant.

Capacitatea ferment-cofactorului complexului VII-FT de a activa F.IX s-a constatat recent, ceea ce explică atît deficitul F.XIa, cît și al celor ce îl activează (activarea prin contact), de a nu deregla procesul de coagulare. Mecanismul activării exercitat de către complexul fermentativ este similar cu al F.XIa și necesită ioni de Ca^{2+}.

Investigațiile au confirmat că FT (al lipidelor) în diverse concentrații reglează activitatea F.IX și X în mod diferit. Preponderent, acest complex (VIIa-FT) activează substratul IX, dar nu și X. În calea extrinsecă a coagulării, la formarea formei intermediare a F.IX, activarea e realizată de componența Xa-FT-Ca^{2+}, care se produce accelerat și numai faza finală de formare a IXa e determinată de complexul VIIa-FT-Ca^{2+}.

Procesul este cooperativ. Apoi IXa, în complex cu VIIIa, FL, Ca^{2+}, activează factorul X – reacția de bază în activarea F.X. Are loc scindarea legăturii Arg-Ile (45-51) la capătul N-terminal în catena grea, eliminîndu-se un peptid cu masa moleculară de 10500 Da. Procesul se produce în prezența ionilor de Ca^{2+} + FL + VIIIa (cofactor).

Antitrombina și heparina favorizează inactivarea (inhibiția) F.IXa. Insuficiența ereditară a F.IX provoacă *maladia Cristmas* (*hemofilia B*), care apare la concentrația de 25% din normă. Există și molecule defecte, apărute la insuficiența ficatului, unde se sintezează acest factor. Procesul de activare a F.X necesită și factorul plachetar 3 – un fosfolipid.

Sunt atestați 9 factori plachetari:

Fp1 - participă la conversia protrombinei în trombină;
Fp2 - conversia fibrinogenului în fibrină;
Fp3 - fosfolipid implicat în formarea F.X;
Fp4 - antiheparină;
Fp5 - serotonină;
Fp6 - fibrinogen plachetar;
Fp7 - trombostenină;
Fp8 - antifibrinolizină;
Fp9 - factor stabilizant al fibrinei.

Factorul XIV – factorul de antisîngerare, anti-Wilebrand sau Nilsson, se remarcă prin funcție, și nu prin natura sa chimică.

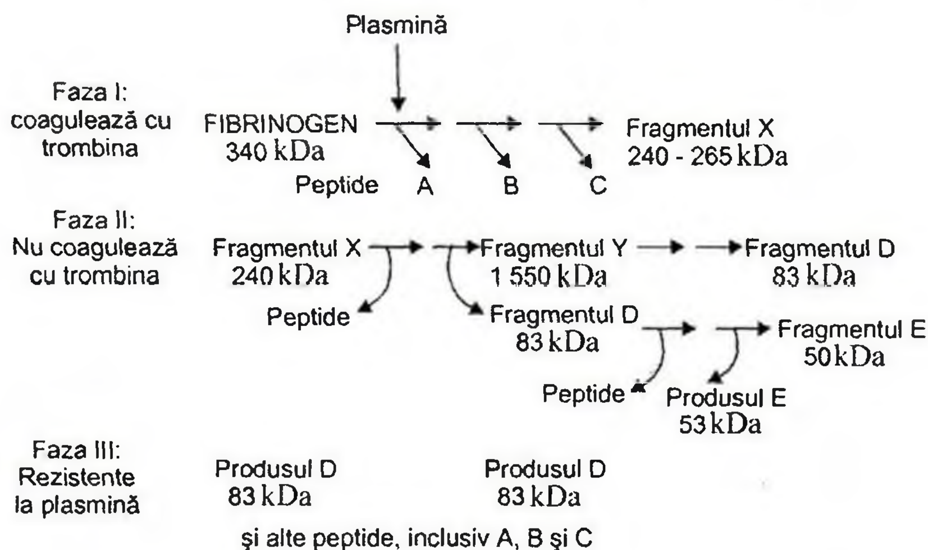
După formarea fibrinei insolubile, urmează *sinereza cheagului* prin eliminarea apei din ochiurile gelului, cu micșorarea spațiului dintre fibrile. *Retracția* se produce cu conlucrarea trombocitelor funcțional normale, ce acționează prin trombostenină (Fp7). ATP trombocitelor asigură contracția Fp7, care antrenează micșorarea în sens longitudinal al fibrelor de fibrină, înregistrînd pasiv atare rezultat.

Fibrinoliza este un proces încontinuu, la fel ca şi coagularea, în cadrul căreia permanent se formează cantităţi neînsemnate de fibrină. S-a stabilit că una din globulinele plasmei – plasminogenul (profibrinolizina), la acţiunea unor factori tisulari sau sanguini, de altfel ca şi la influenţa urokinazei urinei sau a streptokinazei microorganismelor, se reproduce în forma sa activă – *plasmina* (fibrinolizina). Se include mecanismul - cascadă analog cu căile intrin- şi extrinsec ale sistemului de coagulare.

Plasminogenul este o serinprotează formată în hepatocite, prezentă sub formă inactivă în plasmă. Este alcătuit dintr-un singur lanţ polipeptidic cu masa moleculară de 91 kDa. Spre capătul N-terminal format de lizină, lanţul peptidic formează cinci bucle, fiecare cu o afinitate deosebită de a fixa aminoacizi – lizina şi arginina. Centrul activ e situat în capătul C-terminal. Plasminogenul se activează prin proteoliză – ruperea unei singure legături amidice între arginină şi valină. În condiţii fiziologice, activarea se desfăşoară prin mecanismul intrinsec. *Urokinaza* este o serinprotează, sintetizată în rinichi, cu masa moleculară între 33 şi 54 kDa. Cel mai puternic activator al plasminogenului este factorul tisular (ATPG). Ultimul este o serinprotează, cu masa moleculară 50 kDa, care se formează în celulele endoteliale şi SMM. Pot transforma plasminogenul în plasmînă activă şi o serie de serinproteaze nespecifice de origine celulară ca: F.XIa, F.Xa, tripsina, elastaza etc.

Activarea plasminei prin mecanismul extrinsec se datorează factorilor exogeni ca streptokinaza A. Ea se fixează de plasminogen, formînd un complex echimolar. În formă fixată, la o modificare conformaţională, plasminogenul se activează parţial. Acest complex cu activitate proteolitică redusă transformă iniţial cîteva molecule de plasminogen, care prin autocataliză activează progresiv restul moleculelor. Deoarece se obţine uşor, streptokinaza A se administrează cu succes în tratamentul fibrinolitic al trombozelor coronariene şi ale altor vase. Dezavantajul metodei constă în imunogenocitatea puternică a substanţei, cu consecinţe negative în cazul administrării repetate.

Mecanismul de acţiune al plasminei este determinat de caracterul ei endoproteazic cu spectru larg, preferenţial scindînd legăturile peptidice ale argininei. În aşa mod, plasmina activează prin proteoliză şi o serie de alte preproteaze (F.XII, F.XI, protrombina), *in vitro* descompune cazeina şi gelatina. Ca substrat al plasminei serveşte fibrina. În cazul în care este în exces, plasmina descompune atît fibrinogenul nativ, cît şi o serie de factori şi cofactori din plasmă. În urma activării sale, plasmina se fixează pe suprafaţa fibrelor de fibrină din cheag, din care eliberează prin proteoliză o serie de produşi de degradare a fibrinei. Aceşti produşi sunt totdeauna dimeri, fiindcă provin din peptidele învecinate (α, β şi γ). Plasmina atacă şi fibrinogenul. La începutul activării sale, plasmina eliberează prin proteoliză cîte un fragment (A, B, C) din toate cele trei peptide (α, β şi γ). Fibrinogenul rămas are o masă moleculară de 240 kDa şi se numeşte fragmentul X. Acesta, mai departe, se scindează în două fragmente noi: fragmentul D (100 kDa) şi fragmentul Y (100 kDa). Ultimul scindează rapid în încă două fragmente: fragmentul D şi fragmentul E. În decursul fazei terminale a fibrinogenolizei se produc numai fragmentele D şi E. FDP (fibrinogen degradation products) sunt totdeauna monomeri care, în urma activităţii transglutamidazice a factorului de stabilizare a fibrinei, formează exclusiv dimeri.



Mecanismul de acțiune a plasminei

Plasmina transformă pro-metaloproteinazele matriciale în forma activă ce va favoriza degradarea matrixului extracelular.

Efectul proteolitic al plasminei este stopat de *α_1-antitripsina, α_2-macroglobulina* şi de *antiplasmină* – albumina plasmei cu efect antiproteolitic. Ca preparate medicinale ce rețin fibrinoliza se utilizează inhibitori ai proteazei de tipul *acidului aminocaproic, trasilolului (acidul p-aminometilbenzoic), AMCHA (acidul aminometilciclohexanic).*

Reglarea hemostazei

Se produce foarte fin, exact, deoarece formarea cheagului se realizează rapid şi numai în regiunea țesutului lezat. Multe probleme nu sunt soluționate, să zicem: de ce reglarea hemostazei se efectuează în mai multe etape, cu participarea a 2 mecanisme? Cum sunt legate între ele? De ce are loc numai în regiunea afectată?

Un rol primordial îl joacă labilitatea factorilor activi ai coagulării, perioada lor de înjumătățire mică, diluția în sînge, neutralizarea în ficat, scindarea de proteaze, inactivarea lor de către inhibitori etc.

Viteza procesului de coagulare e mai lentă la:

1) temperaturi joase, la utilizarea ustensilelor cu suprafețe de silicon;

2) utilizarea substanțelor ce fixează Ca^{++} – oxalațiilor de Na, K, NH_4, citraților; compuşilor chelați – trilon B (EDTA).

Protrombina, în urma activității sale, poate declanşa coagularea întregului volum plasmatic circulant. O asemenea coagulare intravasculară diseminată sau difuză, chiar şi în urma unor leziuni vasculare serioase se manifestă deosebit de rar datorită existenței şi funcționării unor mecanisme de reglare complexe care, prin interacțiunile lor, asigură menținerea echilibrului efectelor pro- şi anticoagulante. Datorită faptului că trombina este enzima-cheie a coagulării plasmatice, majoritatea efectelor anticoagulante sunt îndreptate împotriva ei şi manifestate de către diferite antitrombine (AT).

Trombomodulina (TM) prezintă un glicoproteid ce se expresează pe suprafaţa celulelor endoteliale, formînd complex cu trombina (1:1). În acest complex trombina îşi modifică specificitatea faţă de unele substraturi proteice – creşte de 1000 de ori afinitatea faţă de proteina C şi, activînd-o, o transformă într-un anticoagulant natural.

Antitrombina I reprezintă cheagul de fibrină. Trombina activă, fixată pe suprafaţa monomerilor de fibrină, este situată în interiorul cheagului, astfel blocîndu-şi activitatea. Însă, în urma unei fibrinolize rapide pot fi eliberate cantităţi însemnate de trombină activă.

Antitrombina II înseamnă activitatea globală a antiproteazelor din plasmă, nespecifice trombinei, aşa precum sunt α_1-antitripsina, α_2-macroglobilina etc. Activitatea lor antitrombinică este, însă, limitată.

Antitrombina III este unicul inhibitor specific al trombinei. Reprezintă o glicoproteină formată dintr-un singur peptid, cu masa moleculară de 58 kDa şi cantităţi normale în plasma sanguină de 0,1-0,12 g/L (2,5 µmol/L). Ea formează cantităţi echimolare cu trombina, blocîndu-i activitatea. Dar pentru aceasta mai are nevoie de prezenţa unui cofactor numit *heparină*. În prezenţa heparinei, molecula de AT III este supusă unor modificări conformaţionale, astfel mărindu-i afinitatea faţă de trombină. Respectiv, activitatea ei creşte aproximativ de o mie de ori. AT III este activă şi în raport cu alte serinproteaze FVIIa, nu numai cu F.Xa. Domeniul funcţional C-terminal interacţionează cu proteinazele, iar cel N-terminal – cu două site-uri de fixare a heparinei şi a heparan sulfatului proteoglicanilor de pe suprafaţa celulelor endoteliale. În decursul coagulării, AT III se consumă. De aceea, din cauza lipsei AT III administrarea heparinei în scop terapeutic poate să nu aibă efectul dorit. În asemenea cazuri, paralel cu heparina este recomandabilă şi administrarea plasmei.

Heparin Cofactor II (HP II) este o glicoproteină cu masa moleculară de 65 kDa. Concetraţia normală în plasma sanguină este de 90 mg/L (1,2 µmol/L). La fel ca AT III, HP II inhibă trombina, dar nu şi $F.X_a$. În cazurile rare ale lipsei congenitale a HP II apare o predispoziţie uşoară spre tromboze, ceea ce ar indica rolul secundar al acestui factor în reglarea hemostazei.

Hirudina din saliva lipitoarelor este un peptid cu masă moleculară de 6 kDa, care inhibă direct trombina, fără prezenţa unui cofactor.

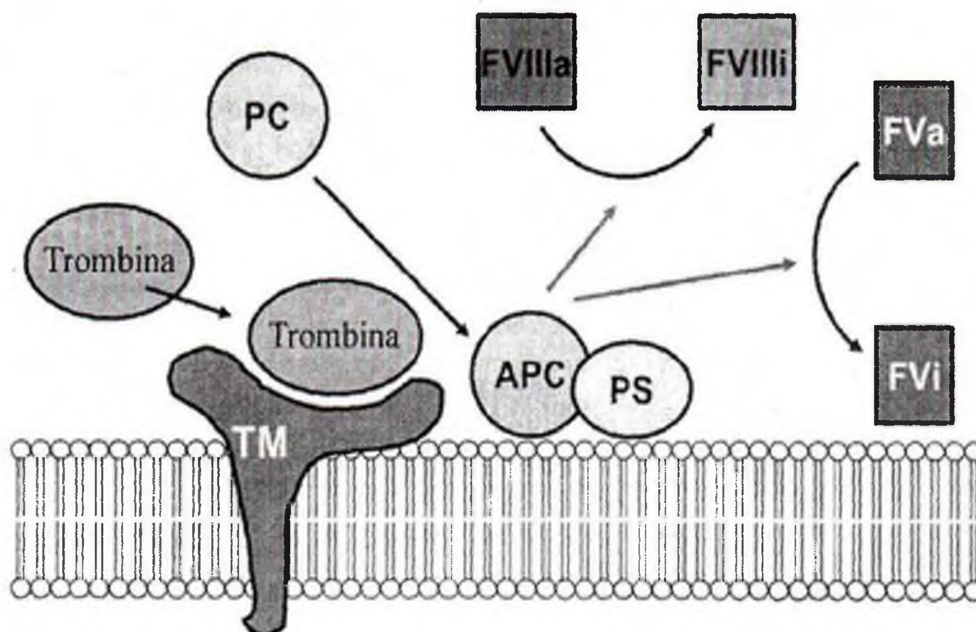
Antitrombina IV este reprezentată de cele două peptide (pretrombinele I şi II) eliberate în cursul activităţii protrombinei. Aceste peptide, fixîndu-se pe suprafaţa trombinei, îi blochează centrul activ. Pretrombina II are un efect inhibitor şi asupra polimerizării monomerilor de fibrină.

Antitrombina V reprezintă suma efectelor complexe antitrombice ale unor imunoglobuline libere sau cuprinse în particulele complexelor imune circulante care, fixîndu-se de trombină, pot bloca, parţial sau total, miezul ei activ.

Antitrombina VI cuprinde produşii de degradare (FDP: fragmentele D, X, Y, E) şi combinaţiile acestora, eliberate în cursul degradării fibrinogenului din plasmă. Aceste fragmente blochează, pe de o parte, centrul activ al trombinei, pe de altă parte, inhibă formarea şi polimerizarea monomerilor de fibrină. Fragmentele X îşi păstrează coagulabilitatea, care poate fi declanşată prin adăugarea *in vitro,* la plasmă, a etanolului sau a sulfatului de protamină. Fenomenul se numeşte *paracoagulare* şi este folosit ca

test de laborator în explorarea stărilor de coagulare intravasculară diseminată.

Proteina C este o serinprotează β globulinică de origine hepatică, dependentă de vit.K, care în prezența cofactorului proteina S şi a fosfolipidelor descompune proteolitic cofactorii activi V, VI, şi VIII. Este activată de excesul de trombină şi inactivată de o altă protează glicoproteică numită *inhibitor APC*. Cele redate sunt ilustrate în schema de mai jos.



Proteina S, dependentă de vit.K, fiind un complex cu APC majorează de 10 ori afinitatea ultimei la fosfolipidele celulelor endoteliale şi ale trombocitelor. Interacțiunea accelerează peste 20 ori capacitatea complexului PC-PS de a inactiva F.Va.

În serul sanguin, aproximativ 40% de proteină S este în stare liberă, cealaltă cotă – în complex cu reglatorul proteic al căii clasice a complementului C4b-BP. Numai fracția liberă posedă funcție de cofactor. Ca şi proteina C, este un cofactor stabil care se consumă în decursul coagulării.

Efectele analogice sunt caracteristice:

3) derivaților cumarolului – inhibitori competitivi ai vitaminei K;

4) veninul şerpilor posedă efect antitromboplastinic;

5) tabaninei - substanță antitrombinică, conținută în saliva unor insecte ce sug sînge.

Concentrația proteinelor hemostaziei *in vivo* oscilează în limite mari: de la nanomoli (FVIIa, VIII) la micromoli (F I, II) (vezi tabelul.8.3), conform DiaSys Diagnostic Systems, 2005.

Tabelul 8.3. ***Masa moleculară şi concentraţia medie în plasmă a proteinelor de coagulare şi inhibitorilor***

Proteina	Concentraţia medie în plasmă		Masa moleculară în Da
1. Fibrinogen	-	1,8 -3,6 g/L	340,000
2. Protrombina (II)	1,4 µmol/L	100-150 mg/L	72,000
3. Factorul tisular(III)	-	110-180 ng/L	44,000
4. Factorul V	30 nmol/L	0,01 g/L	330,000
5. Factorul VII	10 nmol/L	0,5 mg/L	50,000
6. Factorul VIIa	-	0,005 µg/L	50,000
7. Factorul VIII	0,3 nmol/L	100 µg/L	285,000
8. Factorul IX	90 nmol/L	5,1 mg/L	57,000
9. Factorul X	180 nmol/L	10 mg/L	58,500
10. Factorul XI	30 nmol/L	4,8 mg/L	160,000
11. Factorul XIII	30 nmol/L	10 mg/L	320,000
12. Proteina C	65 nmol/L	3,7 mg/L	62,000
13. Proteina S	140 nmol/L	10 mg/L	69,000
14. Trombomodulina	-	2,7-5,4 µg/L	100,000
15. Antitrombina III	2,5 µmol/L	200 mg/L	58,000
16. IFT (inhibitorul factorului tisular)	-	75-120 µg/L	40,000

Majoritatea factorilor de coagulare sunt *serinproteaze*, la fel ca şi cele eliberate din micro- şi macrofage în procesul inflamaţiilor. Aceste serinproteaze se pun în libertate sau se găsesc în lichidele biologice, inclusiv plasmă, sub forma proenzimelor inactive, care se activează tot prin proteoliză de către alte serinproteaze deja active. Ca urmare, activarea prin proteoliză sau prin contact a unui fel de serinprotează, poate să ducă practic la activarea tuturor proenzimelor de acest gen. Ansamblul acestor enzime (proteine scindatoare de proteine) formează în organism un *sistem proteolitic autoamplificator*, cuprinzînd numeroşi reprezentanţi ai enzimelor lizozomale, leucocitare şi plachetare, ai factorilor de coagulare, de properdină şi de complement. Activarea individuală şi globală a acestora este însă controlată în spaţiu şi timp de către antiproteazele din plasmă şi din lichidul interstiţial. Ca urmare, gradul de manifestare a unei coagulopatii, respectiv gravitatea şi extinderea unei inflamaţii, sunt determinate de raportul momentan între activitatea serinproteazelor şi a antiproteazelor.

BIOCHIMIA ŢESUTULUI CONJUNCTIV

Ţesutul conjunctiv este format din matricea extracelulară şi anumite tipuri de celule. Matricea extracelulară (ME) îndeplineşte funcţii structurale şi de suport. Este cel mai răspîndit ţesut al organismelor vii. Dintre cele mai cunoscute sunt: ligamentele, fasciile, tendoanele, matricea organică a oaselor, dinţilor, pielii. Este caracteristic şi organelor moi (ficat, rinichi etc). Înconjoară vasele sanguine, leagă între ele celulele ţesuturilor. Umple cavitatea între celule cu substanţa de bază cu rol organizatoric în ţesuturile ce se dezvoltă. Există numeroase legături structurale şi funcţionale permanente între matrice şi celulele respective. O matrice extracelulară ordonată influenţează organizarea şi funcţionarea celulelor pe care le conţine.

Matricea extracelulară este constituită din proteine fibrilare incluse într-un gel polizaharidic hidratat, care interacţionează şi se asamblează în structuri tridimensionale.

Cele mai importante proteine sunt *colagenul* şi *elastina*. Avînd o cotă de 1/3 din toate proteinele vertebratelor, colagenul, cantitativ, predomină faţă de celelalte proteine.

Colagenul. Se prezintă prin fibre cu structură transversal haşurată, acestea fiind dispuse diferit în dependenţă de funcţia biologică a ţesutului respectiv.

În tendoane există fascicule paralele legate transversal; în piele formează o reţea de densitate neregulată; în corneea ochiului fibrele sunt dispuse în cruce.

Fibrele de colagen rezistă la o tracţiune de 10000 ori mai mare decît greutatea lor; sunt cu mult mai rezistente decît o sîrmă de oţel cu secţiune transversală similară. Dar cum n-ar fi dispuse fibrele de colagen în ţesutul conjunctiv, la microscopia electronică întotdeauna se profilează principiul comun – haşurarea transversal-repetată.

Dintre proprietăţile deosebite se evidenţiază capacitatea de a forma fibrile insolubile, cu o elasticitate mare. Structura fibrelor de colagen este în dependenţă de tipul ţesutului şi corespunde destinaţiei sale. Totodată, colagenul e unicul constituent al organismelor superioare, care manifestă rezistenţă la tracţiune.

Colagen din greceşte înseamnă "a forma clei". Insolubilitatea colagenului pe parcursul multor ani a fost o piedică în studiul proprietăţilor chimice. S-a observat că colagenul din ţesuturile animalelor tinere poate fi extras în formă solubilă, cauza fiind prezenţa în el a unui număr relativ mic de legături transversale. Unitatea structurală de bază este *tropocolagenul* constituit din trei lanţuri polipeptidice de aceeaşi lungime (fig. 8.12).

Componenţa catenelor e dependentă de tipul de colagen (probabil, există nu mai puţin de 10 forme moleculare de colagen).

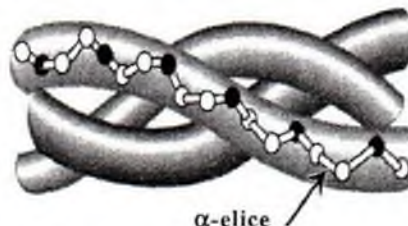


Figura 8.12. *Triplu-α-elice în colagen*

Cele mai răspîndite sunt 4 tipuri de colagen în funcţie de tipul lanţului α constituent:

Colagen tip I – se află în cantităţi mai mari. În organism e constituit din 2 lanţuri de aceeaşi structură $[\alpha_1(I)]_2$ şi al treilea lanţ $[\alpha_2(I)]$. Este localizat în piele, tendoane, oase, cornee, organele interne. Celelalte tipuri au trei lanţuri identice:

Colagen tip II – $[\alpha_1(II)]_3$, localizat în cartilaj, discuri intervertebrale, corpul vitros al ochiului;

Colagen tip III – $[\alpha_1(III)]_3$ – distribuit în pielea fetală, sistemul cardiovascular;

Colagen tip IV – $[\alpha_1(IV)]_3$ – în membrana bazală.

Se numesc α, deoarece au conformația elicei α. De vreme ce secvențele de aminoacizi și hidroxilările la nivelul resturilor de prolil și lizil nu sunt identice în toate lanțurile polipeptidice, se constituie două feluri de lanțuri α, numite, respectiv, α_1 cu variantele I, II, III, IV și lanțuri α_2. Acestea sunt totuși omoloage, formate din circa 1050 resturi de aminoacizi și avînd în multe poziții secvențe identice.

Așadar, colagenul constituie o grupă de proteine înrudite, avînd o structură caracteristică. Dintre aminoacizi predomină glicina (33%), alanina (11%). Mult mai mult decît în alte proteine se conține prolina (23%). Se mai înregistrează doi aminoacizi atipici – hidroxiprolina și hidroxilizina.

~HN—CH₂—CO~ (ciclu cu CH₂) Prolina

O_2, α-Cetoglutarat, Vit.C → H_2O, Succinat + CO_2

~HN—CH₂—CO~ (ciclu cu CH—OH) Hidroxiprolina

Succesiunea resturilor de aminoacizi se caracterizează printr-un grad mare de periodicitate: aproape fiecare al treilea rest aminoacidic este glicină, se succed frecvent resturile Gly-Pro-Hyp. Această partricularitate o deosebește de proteinele globulare, lipsite de astfel de periodicitate. Proprietăți identice posedă și fibrina mătasei și elastina.

Multe resturi de prolină și lizină în colagen se hidroxilează. Formele hidroxilate nu se includ în componența lanțurilor polipeptidice ale colagenului în procesul de sinteză proteică. Hidroxiprolina marcată nu se fixează în colagenul nou – sintetizat experimental la șobolani. Prolina radioactivă poate fi depistată în colagen ca și oxiprolina, ceea ce confirmă că prolina, dar nu hidroxiprolina exogenă, e precursoarea resturilor de hidroxiprolină în colagen.

Procesul de hidroxilare a unor resturi de prolină este catalizat de enzima *prolil hidroxilază* ce posedă în centrul activ atomul de Fe în fieroformă (Fe^{2+}). Donator al atomilor de oxigen, ce se atașează la C_4 al prolinei, este O_2. Procesul e cuplat cu oxidarea α-cetoglutaratului la succinat. Prolilhidroxilaza e o dioxigenază. Reacția necesită și vitamina C grație conservării Fe în fieroformă.

Gal (CH₂OH, HO, OH) –O– Glu (CH₂OH, HO, OH, OH) –O– CH (NH₂—CH₂—CH—CH₂—CH₂) ~NH—CH—CO~

Hidroxilizina

Hidroxilarea e o reacție foarte specifică. Sunt hidroxilate unele fragmente ale lanțului polipeptidic nespi-

ralizat şi sunt hidrozilate numai resturile de prolină situate la capătul aminic al restului de glicină.

Lizil hidroxilaza acţionează conform aceluiaşi mecanism – hidroxilarea la C_5 şi un număr suficient de resturi de lizină.

Structura colagenului conţine şi unele unităţi glucidice, covalent ataşate la hidroxi-lizină. Mai frecvente sunt dizaharidele, glucoza şi galactoza (glicozil galactoza). Ataşa-rea zaharidelor are loc prin activitatea consecutivă a galactozil transferazei şi glucozil transferazei. Enzimele sunt specifice faţă de hidroxilizil nespiralizat. Numărul unităţilor de glucide depinde de tipul colagenului (tipul I are 6, iar IV - 110).

Lanţurile α din constituţia oricărui tip de colagen se deosebeşte de lanţurile α din alte proteine, fiindcă au un pas mult mai mare (9,3E). Distanţa dintre 2 aminoacizi masurată de-a lungul elicei este de 3,3E faţă de 1,4E în lanţurile α obişnuite. Această dispunere spaţială este determinată de numeroasele resturi de prolină aflate în lanţ. Asocierea a trei lanţuri α şi împletirea lor în formă helicoidală rezultă din formarea unei elice triple, cu pasul de 28E. Această structură de bază (ca unitate) e numită *tropocolagen* (TC) (fig.8.13).

Acesta are diametrul de 15E şi lungimea de 3000E. În fibrele de colagen moleculele de TC sunt asociate atît în lungime, cît şi în lăţime. Fiecare moleculă este deplasată faţă de cea alăturată cu un sfert din lungimea ei şi, ca rezultat, fibra capătă un aspect striat, cu zone mai clare, separate de zonele mai întunecate.

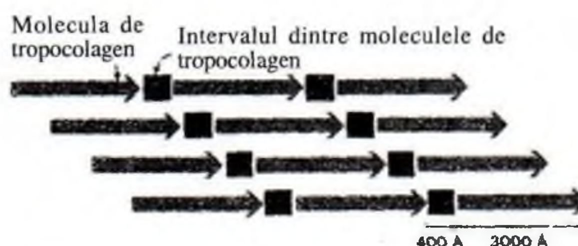


Figura 8.13. *Schema organizării fibrei de colagen*

În lanţ lipsesc legăturile de hidrogen. Stabilitatea elicei e determinată de forţele sterice de respingere a inelelor pirolice din resturile de prolină. Legătura de hidrogen e situată în elicea triplă între grupele NH ale glicinei şi CO a resturilor de acid din alt lanţ. Forţele de hidrogen acţionează perpendicular pe lungimea osiei de tropocolagen; participă şi forţele de hidrogen între grupele OH ale hidroxiprolinei şi ale moleculelor de apă. Tropocolagenul în spaţiu se prezintă sub formă de bastonaş.

Care-i cauza că în poziţia a III-a secvenţei aminoacidice din tropocolagen e situată glicina? Spaţiul intern al triplei elice e foarte mic, ceea ce permite localizarea doar a unui rest de glicină. Fiecărui pas al spiralei îi revin 3 resturi de aminoacizi, fiecare al treilea aparţinînd glicinei. Celelalte două resturi se postează pe partea externă a triplului, unde uşor se stabilizează inelele mari ale prolinei şi hidroxiprolinei. Rolul glicinei e determinat de spaţiul mic, care nu periclitează asocierea lanţurilor polipeptidice, fapt datorat simplităţii glicinei.

La încălzirea soluţiei de tropocolagen, el îşi pierde calităţile fizice – structura triplă spiralizată se distruge, apare *gelatina*.

Pierderea acestei structuri înalt organizate are loc la limite neînsemnate de temperatură. Stabilizarea structurii e determinată de interacţiuni cooperative. Tempera-

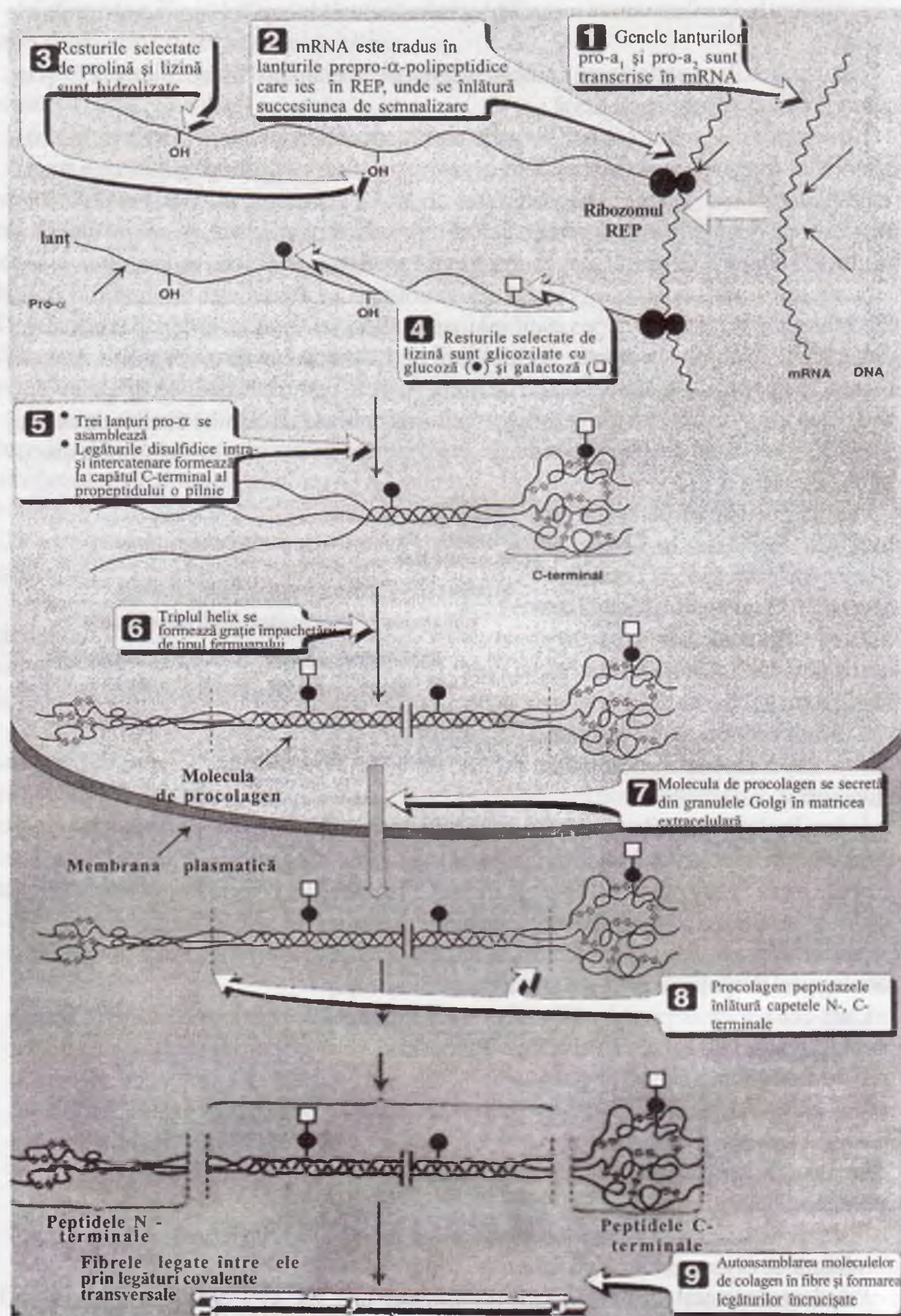


Figura 8.14. *Formarea fibrei de colagen (tip 1)*

tura de topire e acea la care structura spiralizată se pierde pe jumătate.

Acest indice e un criteriu al stabilității acestei triple elice și a colagenului. Colagenul diferitelor organisme diferă în conformitate cu Tt. Diferențele de termostabilitate corelează cu conținutul prolinei și al hidroxiprolinei în colagen. Cu cît mai mulți iminoacizi există, cu atît e mai stabilă spirala de colagen. Stabilitatea crește în procesul evolutiv de la animalele homeotermice la poichilotermice. Pro- și hyp- funcționează în calitate de lacăt, stabilizînd elicea; hidroxilarea amplifică duritatea spiralei:

Exemplu: poly(Pro-Pro-Gly) (-Tt = 24°C)
poly(Pro-Hyp-Gly) (-Tt = 58° C)

Dereglările în hidroxilare este defect biochimic la scorbut. *Vitamina C* asigură funcționarea prolil hidroxilazei. Colagenul sintetizat fără vit.C are o temperatură de topire mică, nu e capabil să formeze fibre normale, duce la afecțiuni ale pielii, vaselor sanguine, ce denotă scorbutul.

Biosinteza colagenului

Sunt atestate 10 etape în cadrul sintezei ordonate pe secvențe bine reglate: asamblarea aminoacizilor (1), hidroxilarea (2), formarea helixului (3), glicozilarea (4), expulzarea din celulă (5), transportul la fibre în evoluție (6), transformarea procolagenului în colagen (7), formarea aldehidelor (8), formarea fibrei (9), stabilirea legăturilor încrucișate (10) (fig.8.14).

Lanțul polipeptidic al colagenului se sintetizează sub forma unui precursor – procolagen, posedînd peptide la ambele capete. Aceste peptide, față de secvența aminoacizilor, diferă fundamental de porțiunea de bază. Ele conțin puțină glicină, prolină și hidroxiprolină.

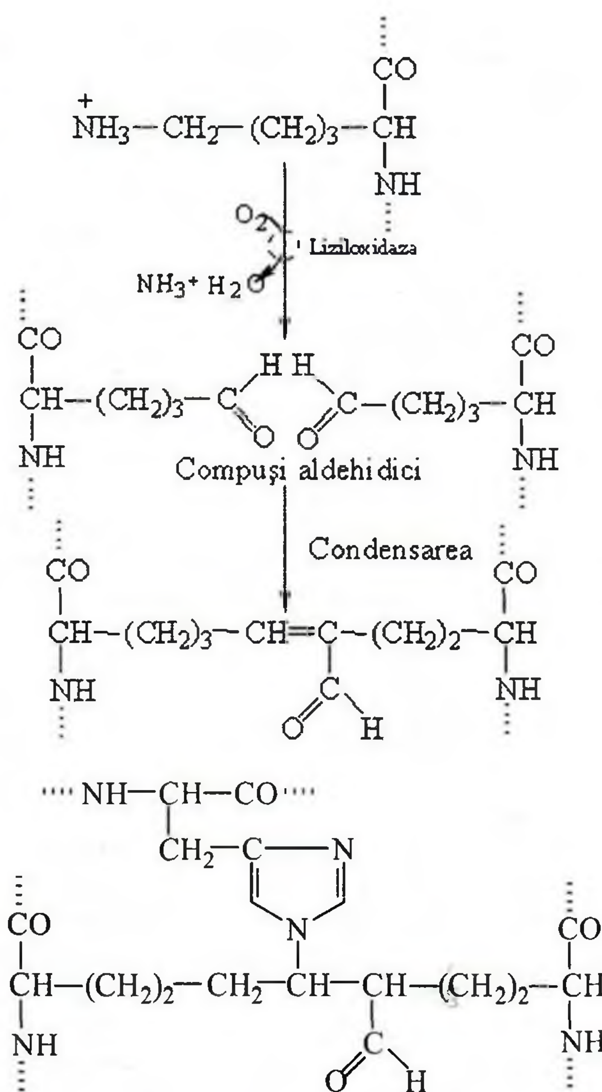
Peptidele N-terminale conțin punți disulfidice intracatenar, cele de la C-terminal sunt legate prin legături disulfidice absente în colagen. Procolagenul este sintetizat de fibroblaști, apoi secretat în spațiul intercelular al țesutului conjunctiv, unde este scindat de procolagen peptidaze (peptide terminale). Dereglările în aceste transformări cauzează o afecțiune generalizată a țesutului conjunctiv. Bolnavii de *sindromul Elers-Danlos* sunt de statură mică, pielea lor e extrem de elastică, au o superflexibilitate a articulațiilor. Suferă și animalele mari cornute – *dermatosparacsis*.

Formarea fibrei de colagen are loc spontan în spațiul extracelular, ca rezultat al atașării specifice a fibrelor de tropocolagen. Microscopia electronică și analiza roentgenostructurală indică că fibrele de colagen sunt striate la interval de 680Å. Moleculele de tropocolagen (TC) nu sunt legate capăt de capăt, au un interval de 400Å, ceea ce comportă un rol important la organizarea oaselor – locusul pentru fixarea cristalelor de fosfat Ca^{2+} (adică locusul de depunere a compușilor minerali ai oaselor). Primele cristale se depun la un interval egal cu 680Å.

Procesul de constituire a colagenului e analog cu formarea fibrinei, unde procolagenul e similar cu fibrinogenul, iar procolagen peptidazele au afinitate analoagă trombinei.

Peptidele terminale împiedică organizarea inoportună a fibrelor participante posibile la transportul procolagenului prin membrana fibroblaștilor. La etapa intracelulară aceste peptide favorizează orientarea reciprocă și fuziunea celor trei lanțuri. Un rol deosebit îl au legăturile disulfidice intercatenare.

Colagenul se formează în lichidul extracelular, în apropierea fibroblaştilor. Ca şi fibrina, este stabilizat de legături covalente încrucişate. Înregistrăm 2 tipuri de legături: intramoleculară, în aceeaşi unitate tropocolagenică şi intermoleculară – între unităţi. Asemenea legături persistă în colagen şi elastină.



Constituirea lor necesită parcurgerea următoarelor categorii de procese extracelulare:

1) Oxidarea unor resturi de Lys şi His la aldehidele respective.

2) Condensarea aldehidelor formate cu resturi de lizină, conducînd la bazele Schiff corespunzătoare.

3) Condensări (aldonică şi crotonică) ale două resturi de aldehidă.

4) Condensarea aldehidei de tip crotonic, cu resturi de histidină.

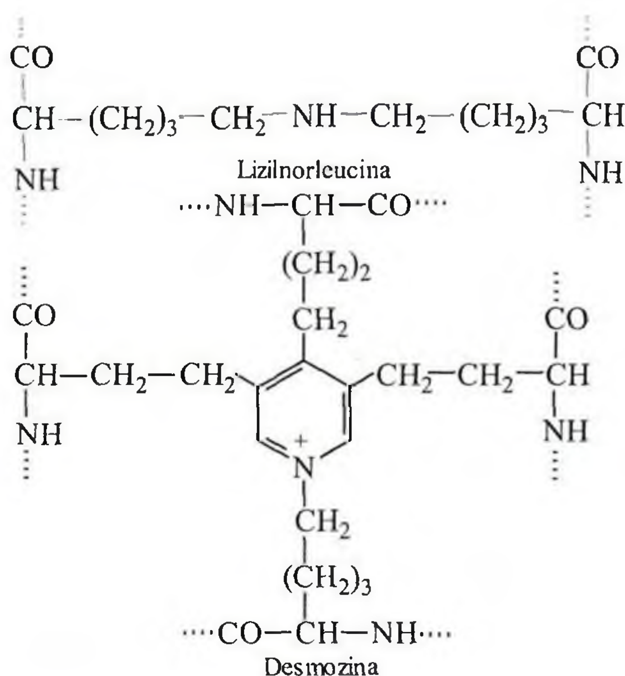
E posibilă legatura covalentă şi cu resturile de lizină. Numărul şi tipul de legături încrucişate sunt dependente de funcţia şi vîrsta ţesutului – tendonul Ahile, de exemplu, are foarte multe legături, pe cînd în coadă sunt foarte puţine.

Biosinteza colagenului decurge la fel în toate ţesuturile, însă microfibrilele rezultate se depun în mod specific în diverse organe (mănunchiuri paralele asociate în acelaşi plan cu proteoglicanii, încît nu se mai pot identifica microfibrilele individuale).

Colagenul diferitelor organe şi ţesuturi se deosebeşte prin diametrul microfibrilelor (de la 150Å la – 1200Å în tendoane). Cu vîrsta, diametrul colagenului în cartilaje creşte cu mult, ajungînd la valoarea maximă de 2000Å.

Rolul acestor legături încrucişate, ce determină gradul mare de elasticitate a fibrelor de colagen, e vădit în *latirism* – o maladie a animalelor cauzată de utilizarea mazării dulci (*Latyris odoratus*). Agentul toxic-*β-aminopropionilnitril* ($N \equiv C{-}CH_2{-}CH_2{-}NH_3$) inhibă conversia restului de lizină în formă de aldehidă. Sub influenţa toxinei, colagenul pierde duritatea mecanică.

Colagenul din diverse țesuturi se reînnoiește în perioade variabile de timp. Investigațiile cu izotopii radioactivi aplicate pe șobolani au demonstrat că timpul de înjumătățire a colagenului din piele e de 200 zile, al celui din mușchi – 60 de zile, iar a celui din ficat – 30 de zile.



Există situații în care regenerarea e mult mai rapidă. Între perioada de degradare și reînnoire (biosinteza) există, în condiții fiziologice, un echilibru.

Degradarea colagenului are loc sub acțiunea enzimei ce scindează legăturile peptidice în anumite fragmente ale colagenului spiralizat. Enzimele, numite colagenaze, sunt secretate în formă neactivă – *procolagenaze*. Colagenazele tisulare se depistează la reptile și mamifere, în țesuturile supuse metamorfozei sau creșterii rapide: în cîteva zile țesutul dispare complet (la mormoloci); la mamifere – în țesuturile supuse reorganizării (uter, după naștere), la cicatrizarea rănilor. Timpul și efectul acestor colagenaze se află sub un control foarte riguros. Colagenaza la mormoloci are o specificitate deosebită – enzima scindînd inițial tropocolagenul într-un loc anumit, – cele 3 lanțuri polipeptidice. Cele 2 fragmente rezultate, la temperatura corpului, se desfac spontan și devin accesibile acțiunii altor enzime proteolitice.

Există și o altă grupă de colagenaze sintetizate de unele microorganisme (Clostridium hystoliticum) – bacterie ce provoacă gangrena gazoasă. Secretă o enzimă ce scindează lanțul polipeptidic în mai mult de 200 de locuri. Ea distruge bariera țesutului conjunctiv, favorizînd pătrunderea bacteriei patogene în organism. Bacteria propriu-zisă nu conține colagen și nu este supusă efectului colagenazei. În urma intervenției colagenazelor, din colagen rezultă peptide, incluzînd hidroxiprolina sau chiar hidroxiprolina liberă, care nu poate fi utilizată pentru sinteza colagenului. Devenind un component al plasmei, este transferată în ficat și degradată. O parte se elimină prin urină. Dozarea ei în plasmă și urină este un indicator perfect pentru aprecierea diverselor stări patologice.

Elastina – proteina fibrelor elastice, se află în țesutul conjunctiv și se asociază cu colagenul, polizaharidele. Are capacitatea de a se lungi de cîteva ori, cu restabilirea ulterioară completă a formei și lungimii. În cantități apreciabile se află în peretele vaselor sanguine (aortă), în tendoane. Se caracterizează printr-o compoziție aminoacidică specifică: ca și în colagen, 1/3 e reprezentată de glicină, prolină, puțină hidro-

xiprolină, precum şi aminoacizi polari, nu are hidroxilizină. Elastina posedă aminoacizi nepolari alifatici - ala, val, leu, ile. În elastina matură există multe legături încrucişate şi de aceea este practic insolubilă.

Din ţesutul porcinelor cu deficit de Cu^{2+} s-a extras un precursor solubil denumit proelastină. Deficitul de Cu^{2+} blochează formarea aldehidelor necesare pentru crearea legăturilor încrucişate în elastină.

Studiul *proelastinei* confirmă prezenţa multor segmente bogate în lizină şi alanină. Anume în aceste fragmente are loc formarea legăturilor covalente încrucişate. Atît în elastină, cît şi în colagen remarcăm o structură ce participă la formarea legăturilor încrucişate - lizil norleucina. Numai elastina conţine desmozină formată din resturile a 4 lizine.

Se sintetizează în fibroblaşti, ca proelastină, devine elastină după secreţia în mediul extracelular. Legăturile transversale asigură elasticitatea în diferite direcţii. Pancreasul secretă proelastaza activată de tripsină, cu transformarea în elastază ce hidrolizează legăturile peptidice constituite de grupa COOH a aminoacizilor alifatici. Enzima posedă o lag - fază şi, în final, se formează peptide, aminoacizi.

Proteoglicanii (PG) – principalul component al substanţei fundamentale din matricea extracelulară. Se caracterizează printr-o mare diversitate tisulară, precum şi a glucidelor (85-90%). Sunt constituentele glicozoaminglicanilor covalent legaţi cu proteinele (5-15%).

Glicozoaminglicanii (GAG) sunt catene mari neramificate, compuse din elemente dizaharidice repetabile. Aceşti compuşi se mai numeau mucopolizaharide. Denumirea actuală e determinată de faptul că în componenţa dizaharidică se conţine un aminozahăr (N-acetil-glucozoamină sau N-acetil-galactozoamină). Prezenţa grupelor carboxil sau sulfat (a ambelor grupări) la majoritatea resturilor de zahăr le aprovizionează cu o sarcină electrică negativă mare. După tipul resturilor de zahăr, tipul legăturii între ele, numărul şi poziţia grupelor sulfat deosebim 7 grupe de glicozoaminglicani (fig.8.15).

Biosinteza are loc în fibroblaşti, cu participarea a trei categorii de compuşi: aminoacizi, glucoză şi radicali sulfurici (PAPS). Se consideră că activarea sulfului se efectuează în baza ATP, sub acţiunea *ATP-sulfurilazei şi APS (adenozil monofosfosulfat) - kinazei.* Prima enzimă îşi intensifică activitatea în prezenţa retinolului, fapt ce explică rolul favorizant al vit.A la anabolismul ţesutului conjunctiv (fig.8.16).

La fel ca şi colagenul, PG, anterior secretaţi sunt modificăti în aparatul Golgi (sulfatarea şi epimerizarea) şi covalent se fixează de resturile de serină sau treonină în proteina *cor.* Moleculele proteoglicanilor se asociază cu fibrele de colagen, formînd o barieră pentru molecule – o sită moleculară.

Proteoglicanii se deosebesc de glicoproteine, al căror component glucidic e de circa 1-60% din masa totală şi e reprezentat prin catene mici ramificate de oligozaharide, care deseori conţin acid sialic.

Proteoglicanii au molecule mult mai mari, componentul glucidic e reprezentat printr-o mulţime de lanţuri neramificate de GAG, normal nu conţin acid sialic şi constituie pînă la 90-95% din masa totală.

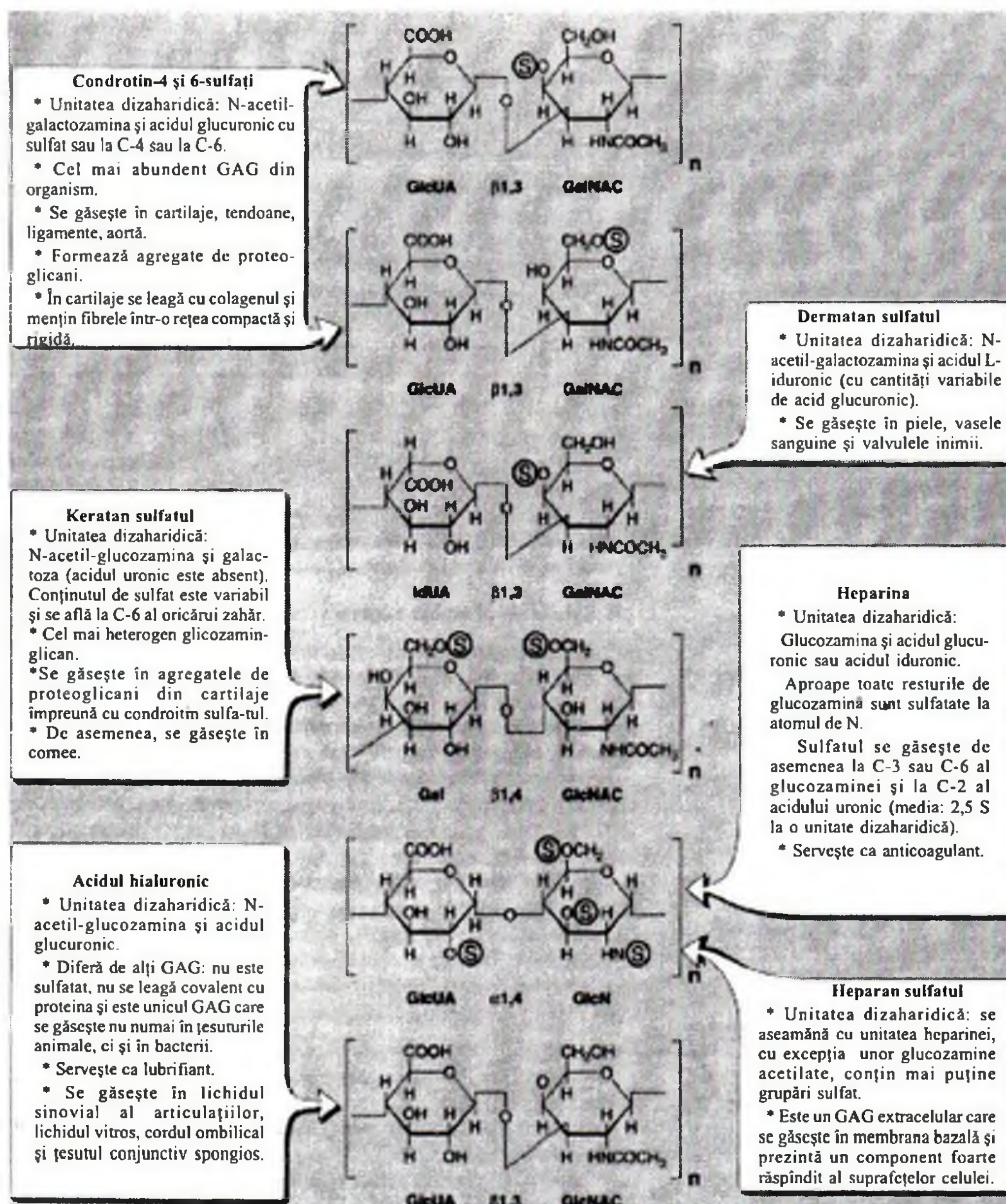


Figura 8.15. ***Formulele structurale ale glicozoaminglicanilor şi rolul lor fiziologic. Notă: S- poziţiile sulfatului, GlcUA - acidul glucuronic, IdUA - acidul iduronic, GalNAC-N-acetilgalactozamina, GlcNAC-N - acetilglucozamina, GlcN - glucozamina, Gal - galactoza***

În principiu, structura PG are o varietate extrem de mare. Lanţurile ocupă un spaţiu vast, nu sunt atît de flexibile ca proteinele ce alcătuiesc structuri globulare. PG formează o conformaţie amorfă şi ocupă un spaţiu mare pentru masa sa. Sunt hidrofile, fixează cantităţi mari de apă şi, fiind în cantităţi foarte mici, prezintă un gel hidratat. Tendinţa dată e amplificată de densitatea mare a sarcinii negative, care atrage cationi activi. Această capacitate de a fixa apa creează în matricea extracelulară un anumit

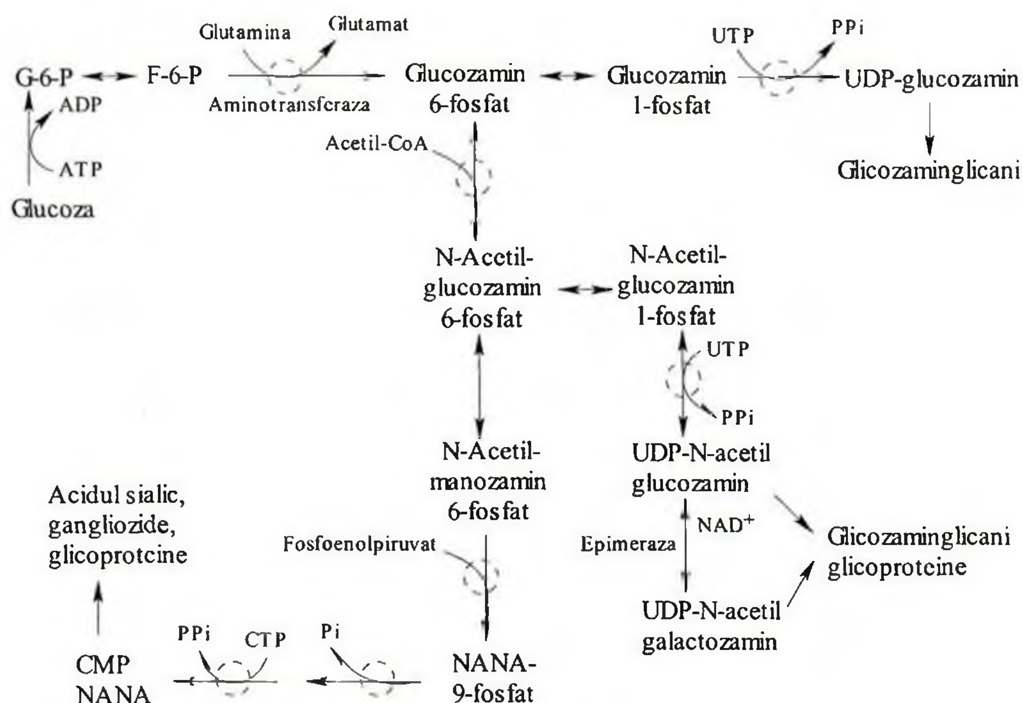


Figura 8.16. ***Sinteza aminozaharidelor: NANA - acidul N-acetil-neuraminic***

turgor ce se opune compresiei, pe cînd fibrele de colagen se opun forțelor de extindere.

Datorită dispunerii amorfe şi a gradului mare de hidratație, lanțurile PG nu împiedică difuzia rapidă a moleculelor hidrosolubile, ca de altfel şi transferul celulelor. PG ocupă un spațiu intercelular, cu toate că reprezintă mai puțin de 10% din numărul proteinelor fibrilare.

E de menționat rolul deosebit al *acidului hialuronic* în migrarea celulelor la tratarea rănilor în plin proces de dezvoltare. Cantități mari se formează în țesuturi. Scindarea lui de enzima hialuronidaza este însoțită de inhibiția migrației celulelor. E evident că amplificarea locală a sintezei acidului hialuronic cu absorbția apei, ce duce la tumefierea matricei, poate servi drept strategie generală de facilități pentru migrația celulelor în procesele de regenerație şi morfogeneză. Nu e exclus că PG formează un spațiu hidratat intercelular, dar şi geluri cu pori de mărime diferită, cît şi cu o densitate a sarcinii diferită, ce poate servi în calitate de filtre de reglare a mişcării moleculelor şi celulelor, în concordanță cu mărimea şi sarcina lor. Aceasta necesită un grad susținut de regularitate a lanțurilor de PG în matrice.

Forma concretă de organizare nu e identificată definitiv. Moleculele interacționează nu numai între ele, dar şi cu moleculele de colagen, glicoproteine, formînd, în fine, o varietate amplă de structuri tridimensionale. Lanțurile de proteoglicani pot forma spontan structuri de un înalt nivel de organizare spiralizată şi în formă de bandă. PG se asamblează în agregate, formînd structuri de tipul periei, avînd în centru acid hialuronic,

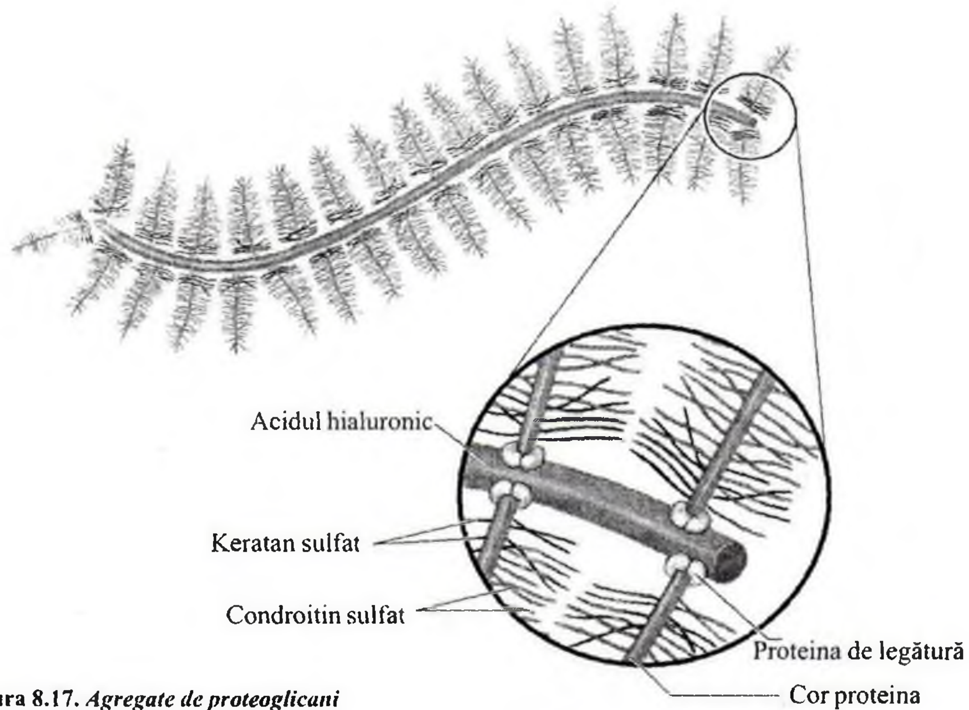


Figura 8.17. ***Agregate de proteoglicani***

iar la ramificări – PG (keratan sulfat scurte şi lungi – condroitin sulfat) (fig.8.17, 17a). Agregarea este amplificată de cationii polivalenţi de tipul Ca^{++}.

Acidului hialuronic îi este proprie o vîscozitate, ce-i permite să servească în calitate de lubrifiant în articulaţii. Modificările în vîscozitatea lichidului, în afecţiunile reumatoide sunt o consecinţă a dereglărilor ce au loc în structura proteoglicanilor.

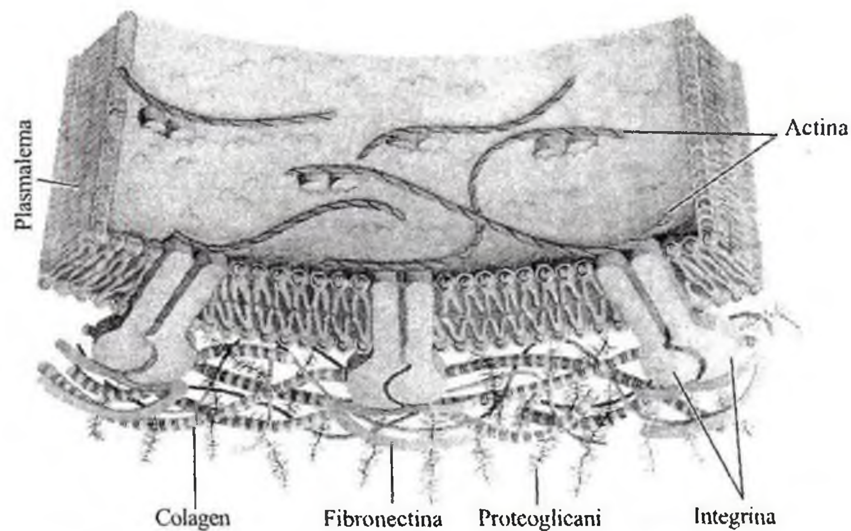


Figura 8.17a. ***Interacţiunea celulelor în matricea extracelulară***

Funcționînd ca niște site moleculare, PG reglează pătrunderea prin ei a moleculelor mari (proteine etc.). În organism există un echilibru dinamic permanent între biosinteză și degradare. Degradarea PG se produce cu mult mai rapid decît a colagenului, în majoritatea țesuturilor, în rinichi – 3-8 zile. Produsele scindării se excretă prin urină – cantitatea diurnă 250 mg. *Proteoglicanaza* (o metalenzimă cu un pH cuprins într-un domeniu larg – 5-9) are proprietăți diverse și scindează hidrolitic legăturile între condroitin sulfat și proteina centrală în multe regiuni și în numeroși PG.

Enzima are și capacitatea de a proteja peptidele de extensie, precum și de a degrada glicoproteina matriceală. Ulterior, intră în funcțiune endo- și exoglicozidazele, sulfatazele; dintre glicozidaze – *β-glucuronidaza, α-iduronidaza, β-acetil-hexozaminaza, β-galactozidaza, aril-sulfatazele* (fig.8.18).

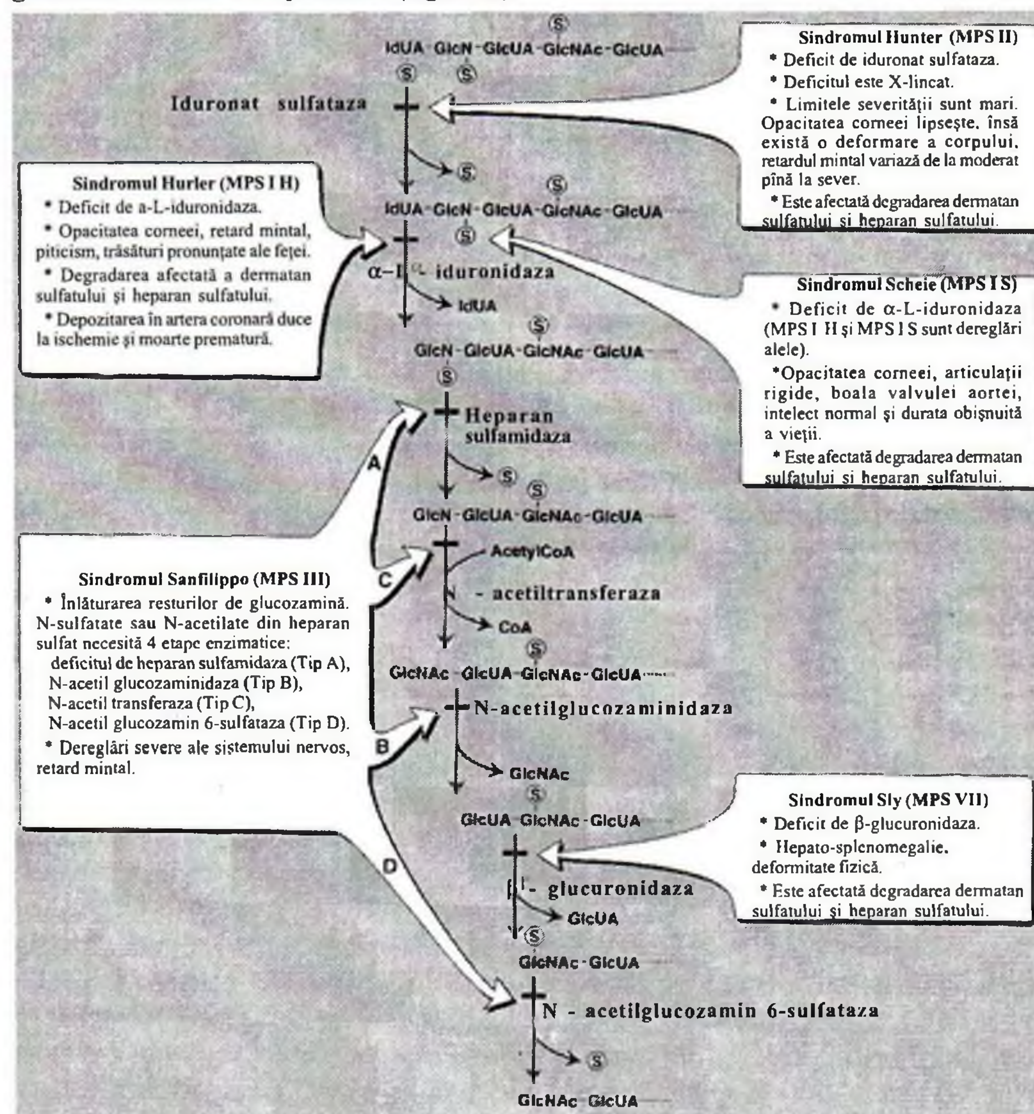


Figura 8.18. *Degradarea glicozaminglicanilor de enzimele lizozomale. Mucopolisaharidozele în deficiența enzimatică*

Modificările constituenților PG

Distingem modificări fiziologice asociate, cu înaintarea în vîrstă, și patologice cauzate de funcționarea anormală a unor enzime participante la ana- sau catabolismul lor. În funcție de vîrstă, e stabilită majorarea cantității de colagen, ca, de altfel, și a keratan sulfatului în țesuturi, unde se localizează.

Conținutul condroitin sulfatului în cartilaje, discuri intervertebrale și al acidului hialuronic în piele se micșorează. Aceste schimbări au efecte importante pentru gradul de hidratare, precum și pentru posibilitatea eventualei calcifieri (în cartilaje, oase).

Hormonul de creștere (GH) stimulează adiționarea prolinei în lanțul tropocolagenului. Administrarea lui la orice vîrstă apropie caracterul sintezei PG de procesele ce au loc la animalele tinere – amplifică proliferația celulelor și stimulează atașarea grupelor sulfat în PG.

Testosteronul amplifică viteza sintezei acidului hialuronic, la fel ca și *insulina* (plus condroitin sulfații). La diabet sunt vădite consecințele inhibiției sintezei PG, amplificarea degenerației vaselor, vindecarea tardivă a rănilor, cînd pacienții sunt mai sensibili la infecție. Stimulează sinteza PG și *mineralocorticoizii*, amplificînd proliferarea fibroblaștilor.

Glucocorticoizii administrați conduc la repolimerizarea acidului hialuronic și a altor PG, inhibă sinteza, reducînd acțiunea defavorizantă a acestor hormoni în procesul de tratare a rănilor.

Mucopolizaharidozele sunt o categorie de boli genetice, ce se caracterizează prin depozitarea în țesuturi și excreția urinară a GAG, ca rezultat al insufucienței unei sau mai multor enzime lizozomale implicate în degradarea lor. Au loc modificări în structura scheletului, în dezvoltarea organelor, afecțiuni mintale, tulburări cardiopulmonare de diverse genuri și intensități (fig.8.18).

Defectul *enzimatic* specific se stabilește prin fixarea activității unor enzime în lichidul amniotic.

BIOCHIMIA RĂSPUNSULUI IMUN

Simplele observații asupra faptului că oamenii care au suferit de unele maladii infecțioase devin apoi nereceptivi la ele, au condus la apariția științei despre sistemul imun – **imunologia.** Răspunsul imun este foarte specific, și anume această specificitate reprezintă o particularitate fundamentală a reacțiilor imune.

Mesajul imun este o elaborare recentă a evoluției biologice. El se manifestă numai la vertebratele superioare. Grație activității sistemului imun, substanțele nocive, moleculele toxice se afectează și se elimină din organism. Chintesența sistemului imun constă în distrugerea moleculelor străine, dar nicidecum a celor proprii.

Capacitatea de a distinge ce e propriu și ce-i impropriu e o altă proprietate fundamentală a sistemului imun (SI). Rar cînd SI confundă celulele proprii cu cele străine. În circumstanțele date acționează prompt, declanșînd reacții autoimune, cu eventuală letalitate.

Corpul străin care stimulează producerea de anticorpi (provoacă răspunsul imun) e denumit **antigen**. SI e capabil să distingă antigeni analogi, de exemplu: 2 proteine ce diferă doar printr-un aminoacid sau doi izomeri optici.

Ansamblul de reacții specifice ale unui organism sau sistem celular, declanșate prin contactul cu substanța străină, poate fi de două tipuri:

1) *Umoral.* Contribuie la elaborarea anticorpilor care circulă prin sînge și specific leagă substanțele străine ce le-au provocat sinteza. Fiind înglobați în fagocite, stimulează un sistem de proteine sanguine (complementul), ce provoacă afectarea antigenului.

2) *Celular.* Constă în generarea celulelor specializate ce reacționează cu antigenul străin pe suprafața celulelor proprii ale organismului (pot fi afectate de viruși sau la distrugerea antigenului de către macrofage).

Așadar, sunt firești 3 întrebări cardinale apărute:

1) Cum SI identifică specific milioanele de molecule străine și reacționează la ele?

2) Cum se disting moleculele proprii de cele improprii?

3) Cum se diferențiază grupele de microorganisme și în ce constă mecanismul de reglare a răspunsului, ca să protejeze cît mai efectiv organismul de numeroși factori patogeni?

Sistemul imun este un organ difuz răspîndit în majoritatea țesuturilor. Coordonatori ai ambelor tipuri de imunitate sunt limfocitele, aproximativ $2x10^{12}$ celule, 99% dintre ele fiind situate în organele productive, ganglioni limfatici, măduvă, timus, splină (fig.8.19).

Există 2 populații de limfocite: "T"- timodependente și "B"- bursodependente. Denumirile provin de la organele limfoide centrale respective – timus și măduva osoasă.

Se consideră că diferențierea limfocitelor "T" și "B" din celulele de origine e realizată de hormonii specifici: *timopectina și ubicuitina* – hormon polipeptidic izolat din toate țesuturile. În mecanismul de reglare este implicat AMPc. Morfologic, "T" limfocitele reprezintă sfere cu suprafețe netede și au foarte puține vilozități, pe cînd "B" limfocitele au numeroase vilozități. Durata supraviețuirii "T" celulei e de luni, ani, iar a "B" de zile, săptămîni. Locul de formare pentru ambele tipuri e măduva osoasă, pe cînd locul de diferențiere e timusul și organele limfoide periferice. Limfocitele "B" intră în acțiune spontan, pe cînd limfocitele "T" se includ mai tardiv.

Celulele plasmatice constituie "B" limfocite mai mature, cu un reticul endoplasmatic granular foarte dezvoltat, ce posedă o morfologie caracteristică. "T" şi "B" celulele diferă morfologic pronunţat numai după stimularea lor de către antigen.

Majoritatea limfocitelor "T" şi "B" circulă permanent din sînge spre limfă şi viceversa. Circulaţia permanentă determină contactul majorităţii limfocitelor cu antigenul şi serveşte la distribuirea celulelor "T" şi "B" activate în ţesuturile limfoide ale corpului. Evident că în ganglionii limfatici celulele "T" şi "B" spaţial sunt separate în diferite zone: în ganglionii limfatici –"B" celule, în stratul paracortical –"T" celule.

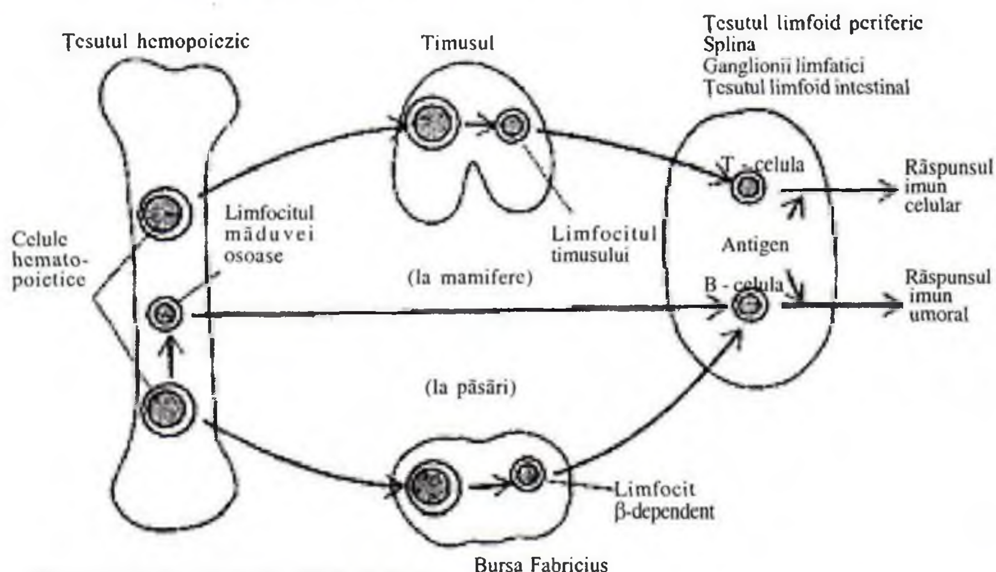


Figura 8.19. ***Evoluţia T- şi B-limfocitelor***

Cea mai impresionantă proprietate a sistemului imun e capacitatea lui de a reacţiona perfect selectiv la milioane de antigeni străini.

La ora actuală e acceptată teoria selecţiei clonale, care presupune că informaţia de structură pentru orice fel de anticorpi preexistă în genomul celulelor formatoare sau numai pentru unele dintre acestea (*clone*). Antigenul acţionează ca depresor al mesajului genetic preexistent. Acest deziderat este confirmat prin investigaţii convingătoare. Dacă limfocitele animalului neimunizat se incubează în eprubetă cu unul din antigenii marcaţi A,B,C,G, apoi un procent foarte mic (<0,01%) de limfocite va fixa acest antigen. Aceasta înseamnă că foarte puţine celule conduc receptori specifici spre A,B,C,G. O astfel de interpretare este argumentată prin următorul experiment: antigenul A este foarte radioactiv şi orice celulă care îl fixează captează o doză letală. Celulele rămase nu sunt capabile să reacţioneze la A antigen, însă reacţionează normal la ceilalţi antigeni.

Experimentele efectuate confirmă:

1) Limfocitele sunt predestinate reacţiei cu un anumit antigen, pînă la declanşarea acţiunii acestuia.

2) Limfocitele sunt posesoare ale receptorilor de la suprafaţă, legînd, de regulă, un antigen sau altul.

Majoritatea macromoleculelor polizaharidelor, practic toate proteinele, pot servi ca antigeni. Secvențele de grupări chimice, interacționînd cu receptorii limfocitelor sau cu locusul specific al moleculei de anticorpi, care propriu-zis realizează efectul imun, se numesc *determinant antigenic* sau *epitop*. Moleculele care se fixează în ambele cazuri, dar nu induc răspunsul imun, sunt denumite *haptene*. Ele devin antigeni perfecți, dacă se vor fixa de un suport macromolecular – proteina. Sunt determinate mai imunogene-imunodominante. Ele posedă un complet de determinante antigenice.

O determinantă poate activa mai multe clone cu receptori la suprafață, ce posedă o sensibilitate diferită. Rezultă un răspuns policlonal sau poate fi și oligoclonal (cîteva). SI, la fel ca și sistemul nervos, posedă capacitatea de memorare. Imunitatea organismului e viabilă pe toată durata vieții la multe boli virotice.

De la primul contact cu antigenul rezultă un răspuns imun primar după o fază - lag de cîteva zile și continuă conform schemei alăturate (fig.8.20).

Răspunsul imun secundar are o perioadă-lag mult mai scurtă, o reacție mai pronunțată și de o durată mai lungă. Răspunsul secundar confirmă păstrarea memoriei despre antigenul A, fiindcă la contactul cu un alt antigen-B reacția animalului va avea un caracter primar.

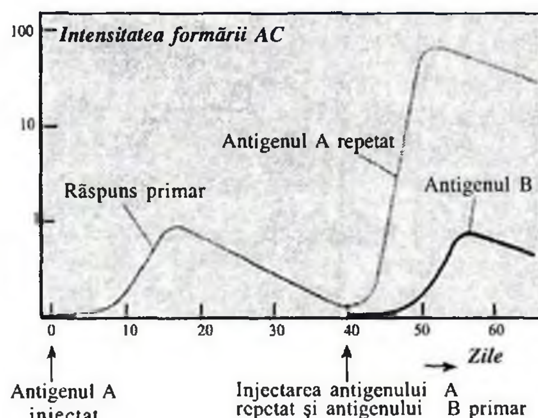


Figura 8.20. ***Răspunsul umoral primar și secundar indus de infuzia antigenului A și B***

În țesuturile limfoide periferice ale animalului adult, populația "T" și "B" limfocite, conține concomitent celule la trei stadii de diferențiere: celule-precursoare, celule de memorare, celule-efectoare.Unele dintre celulele -precursoare, la contactul primar cu antigenul, se reproduc și se prefac în celule-efectoare (T sau B). Alte (T sau B) celule, celulele-precursoare sunt stimulate, diferențiindu-se în celule de memorare. Acestea nefiind mesagere, ușor se transformă în celule-efectoare la o contactare repetată cu același antigen. Ultimele celule circulă permanent și pot supraviețui ani de zile, fără a se reproduce.

Cum anume SI distinge celulele improprii ? Una din posibilități constă în faptul că genele moștenite codifică receptorii anume pentru antigenii străini, dar nu pentru cei proprii. Așadar, sistemul imunitar e programat genetic să reacționeze la antigenii străini. Posibil că SI învață în perioada postnatală să nu reacționeze la antigenii săi.

Experimentele au confirmat concluzia că prezența permanentă a antigenilor străini, începînd cu perioada în care sistemul imun încă nu e capabil de mesaj (este imatur), implică blocarea continuă a reacțiilor imune la antigenii străini. O atare stare de incapacitate indusă antigenospecifică precară la răspunsul imun se numește *toleranță imunologică dobîndită.*

Cercetările efectuate în 1962 au confirmat că și *toleranța naturală imunologică* la propriile țesuturi nu e înnăscută. Experimentele fine asupra hipofizei mormolocului au

demonstrat că SI potențial e capabil să reacționeze la antigenii propriului organism, dar în procesul de dezvoltare învață a nu o face. Se elucidează că pentru menținerea toleranței naturale se reclamă prezența "propriilor" antigeni. Dacă antigenii proprii sunt înlăturați, apoi și peste săptămîni, luni organismul va reacționa prin fenomene imunologice exprimate. Dereglarea toleranței la antigenii proprii conduce la o reacție a T și B limfocite, succedată de reacții autoimune responsabile pentru diferite maladii (fig.8.21).

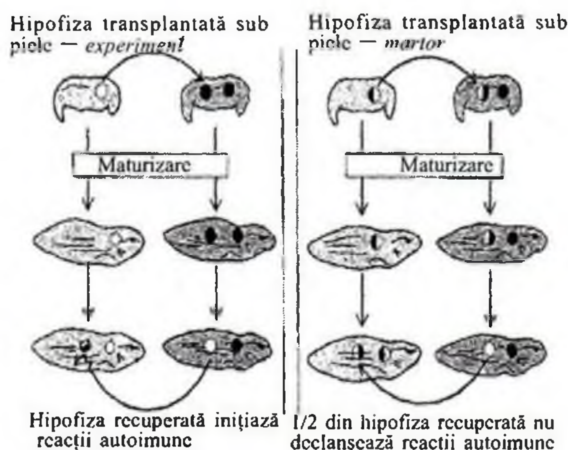


Figura 8.21. ***Schema experienței ce ilustrează că SI e capabil să interacționeze cu țesuturile organismului, dar în procesul dezvoltării «învață» să nu procedeze așa***

Toleranța imunologică poate fi indusă și organismelor animale mature fară antigeni străini, însă e cu mult mai dificilă decît în perioada postnatală. E oportună administrarea antigenului în: 1) doze mici, repetate; 2) împreună cu imunodepresanți; 3) intravenos, după ultracentrifugarea antigenului. Animalul va reacționa normal la alți antigeni, ceea ce denotă că toleranța imunologică și memorarea imună sunt antigenospecifice.

Mecanismul funcționează perfect datorită faptului că în unele cazuri clonele de limfocite, ce ar reacționa cu acest antigen, sunt eliminate, în altele – ele supraviețuiesc, dar reacția la antigen este specific supresată de T-limfocitele corespunzătoare denumite *T celule-supresoare.*

Pentru ca substanța străină să reprezinte un antigen specific, ar trebui să posede unele proprietăți (*condiții de antigenitate*):

a) să aibă o structură chimică diferită a substanțelor similare din organismul receptor;

b)să posede un grad ridicat de complexitate structurală și dimensiune moleculară mare;

c) să conlucreze cu unele grupări chimice ce conferă moleculei un grad major de stabilitate structurală, o configurație fixă (o anumită rigiditate);

d) substanța să fie improprie organismului receptor;

e) să provină dintr-o sursă taxonomic distanțată de animalul receptor.

Polizaharidele atestă capacități imunologice mai slabe decît proteinele, însă pot asigura reacții de specificitate determinate de:

a) structura chimică a moleculei de antigen;

b) natura chimică și orientarea spațială, cu poziții relativ libere ale grupărilor active în molecula antigenică;

c) secvența elementelor componente ale moleculei polimerului (aminoacizi);

d) gradul și modul de torsionare a polimerului;

e) specificitatea asigurată de rolul izomeriei optice;

f) izomeria de poziție, în special a poziției relativ libere a grupărilor funcționale, mai

ales ale aminoacidului C-terminal;

g) structurile specifice ale antigenilor, reprezentate prin zaharide, una din molecule fiind imunodominantă, situată de obicei la extremitatea lanțului poliozidic.

Antigenii au anumită *valență*, exprimată prin numărul de molecule de anticorpi, ce reacționează la o singură moleculă de antigen. Sunt dependenți de numărul determinanților antigenici ai unei molecule (între 5-15).

Unica funcție bine cunoscută a B-limfocitelor este producerea anticorpilor, cu o particularitate unică de a exista în milioane de tipuri, fiecare cu un situs deosebit pentru fixarea antigenului. Aceste proteine sunt denumite *imunoglobuline (Ig)* – o clasă fundamentală a proteinelor sanguine, reprezentînd aproximativ 20% din proteina plasmatică sumară.

Toate moleculele de anticorpi sintetizate de o celulă-B au situs identic pentru fixarea antigenului. Primii anticorpi nu sunt secretați, dar se acumulează în membrana plasmatică, servind drept receptori pentru antigen. Fiecare B-celulă are aproximativ 10^5 asemenea molecule.

Antigenul fixat inițiază un lanț de fenomene, care implică proliferarea celulară şi diferențierea celulelor, cu secretarea anticorpilor. Aceste celule au situs identic de fixare a antigenului. Celulele B activate secretează anticorpi, finalizînd diferențieri în celula plasmatică, care, la rîndul ei, îi secretează cu o viteză de 2000 molecule pe secundă. Utilizînd capacitatea de sinteză, nu mai sunt capabile de evoluare şi diferențiere, lichidîndu-se la cîteva zile după secretarea anticorpilor.

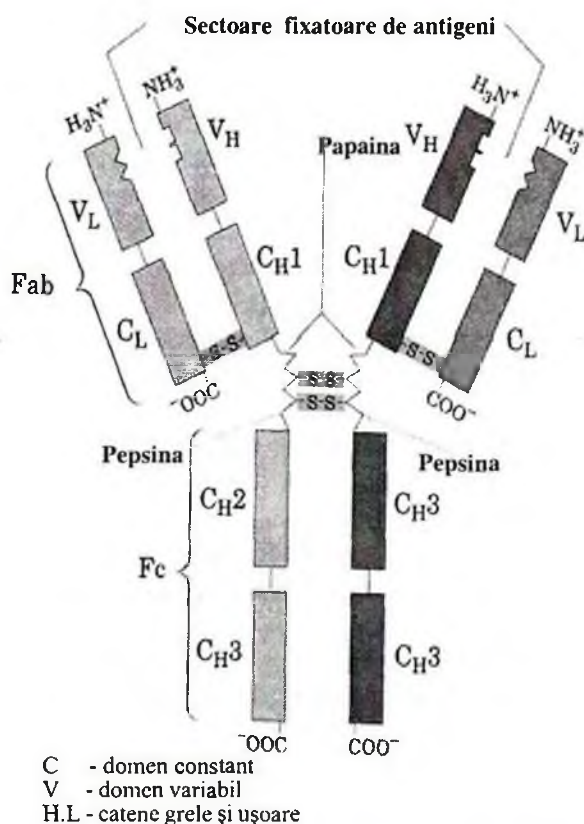


Figura 8.22. ***Structura imunoglobulinei G. Fragmentele la scindarea imunoglobulinei cu enzime proteolitice***

Proprietatea de protejare susținută de anticorpi constă nu numai în fixarea antigenului, dar şi în alte funcții, cu ajutorul propriei codițe, ceea ce deter-mină soarta antigenului fixat.

În studiul structural al anticorpilor, un rol deosebit îl joacă scindarea moleculei cu enzimele proteolitice (*papaina şi pepsina*), formînd fragmente (fig.8.22).

Unitatea structurală de bază a moleculei anticorpului o formează 4 lanțuri polipeptidice identice – 2 "L" lanțuri uşoare şi două grele "H", fiind asociate



Figura 8.23. ***Anticorpii tuturor claselor posedă H-catenă tipică, ce conferă regiunii Fc o anumită conformaţie***

între ele prin interacţiuni necovalente şi legături covalente (punţi disulfidice). Examinările scindării moleculelor respective cu enzime proteolitice (papaina şi pepsina) au elucidat structura lor.

Lanţul greu "H" stabileşte caracterul clasei de imunoglobuline, are masa moleculară ~ 50.000-70.000Da, e de natură glicopeptidică. Există 5 tipuri de lanţuri (de Ig) desemnate prin litere greceşti (γ = Ig G; α = Ig A; μ =Ig M; δ = Ig D; ε = Ig E).

Diferenţierea de natură a lanţului H este exprimată prin antigenitatea proprie fiecăruia, derivată de secvenţa aminoacidică în catenele respective (fig.8.23). Diferenţa de secvenţe şi dimensiuni ale lanţul "H" din fiecăre clasă determină subclasele (4 Ig G; 2 pentru Ig A şi 2 - Ig M). Lanţurile uşoare "L" există în două forme: de tipul K-(Kapa) şi λ-(Lambda). Într-o moleculă de Ig, lanţurile uşoare aparţin unui singur tip. Niciodată ambele tipuri nu se întîlnesc în aceeaşi moleculă.

Ambele categorii de lanţuri (H şi L) posedă în structura lor două genuri de regiuni – unele variabile (V) şi altele constante (C), din punct de vedere al secvenţei aminoacizilor ce intră în compoziţia lor.

Modificările de secvenţă în regiunea constantă a lanţurilor uşoare determină apariţia de subtipuri. Regiunile variabile ale ambelor lanţuri, posibil, diferă de secvenţa aminoacidică ce fixează subgrupele de imunoglobuline.

IgG, clasa de bază a imunoglobulinelor sanguine, aprox. 12 g/L, asigură răspunsul imun secundar. Regiunea Fc (cristalizabilă) se fixează de receptorul specific al celulei fagocitare, care în final înglobează şi distruge microorganişmele acoperite cu Ig G - anticorpi. Regiunea Fc se fixează de prima componentă a complementului, activîndu-l (fig.8.24). Această clasă de imunoglobuline e unică şi posedă o capacitate transplacentară. Domeniile imunoglobulinelor îndeplinesc funcţii distincte - V_H şi V_L situsul de îmbinare cu antigenul; cele C mediază fixarea complementului şi, posibil, controlează catabolizarea lor (Ig); posedă şi situsuri de îmbinare cu receptorii celulari. Are o formă moleculară T în absenţa antigenului şi Y – în prezenţa acestuia (fig.8.25).

În fazele timpurii ale răspunsului imun primar în sînge predomină anticorpii *IgM,* care reprezintă o structură circulară pentamerică compusă din 5 unităţi cu 4 lanţuri fiecare, avînd 10 situsuri de fixare a antigenului (fig.8.26). Aceşti pentameri efectiv activizează sistemul complementului. IgM e prima clasă de anticorpi produşi de celulele B în evoluţie. Aceşti anticorpi se încadrează în membrana plasmatică şi devin receptori

pentru antigen; pre-B-celulă devine B limfocit şi poate reacţiona la antigen.

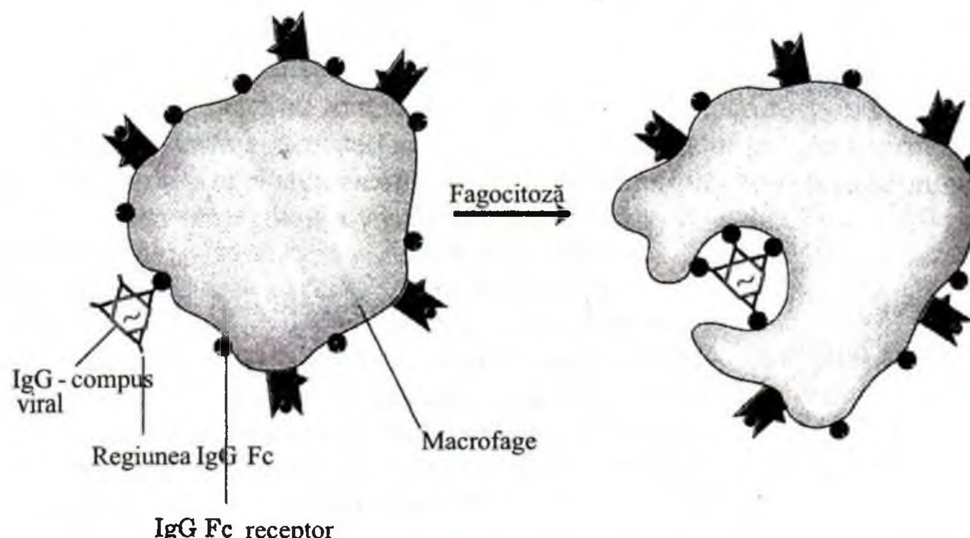


Figura 8.24. *Fagocitoza complexului aticorp-viral de macrofage. Fc - receptorul ce fixează anticorpi*

Foarte puţine B-celule sunt activate pentru secreţia *Ig D*, care susţin rolul de receptori pentru antigeni. Concentraţia lor creşte considerabil la gravide, în timpul travaliului. Se creează impresia că aceşti receptori de pe limfocite ar putea servi drept stimulatori pentru divizarea şi diferenţierea celulelor indicate.

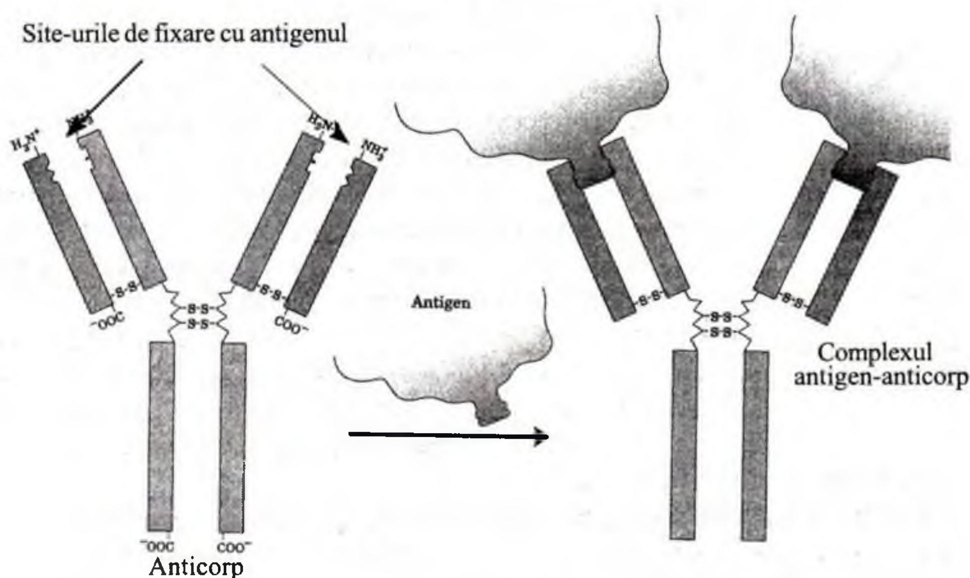


Figura 8.25. *IgG fixează antigenul*

IgA – clasa de bază a anticorpilor în secreții (lapte, salivă, lacrimi, secrețiile tractului respirator şi intestinal), poate exista în forma de un monomer compus din 4 lanțuri, ca la IgG, sau reprezintă formă dimerică (93%) (fig.8.27). Dimerizarea se realizează prin intermediul unui polipeptid - J şi al unei glicoproteine denumite *componentă secretorie*, pe care dimerii o capătă pe suprafața celulelor epiteliale, unde se şi sintetizează. Ulterior, sunt transferate pe suprafața bazală, servind ca receptori pentru fixarea Ig A din sînge. Această proteină facilitează transportul imun al globulinei şi, posibil, protejează molecula IgA de digestia enzimelor proteolitice din secreții.

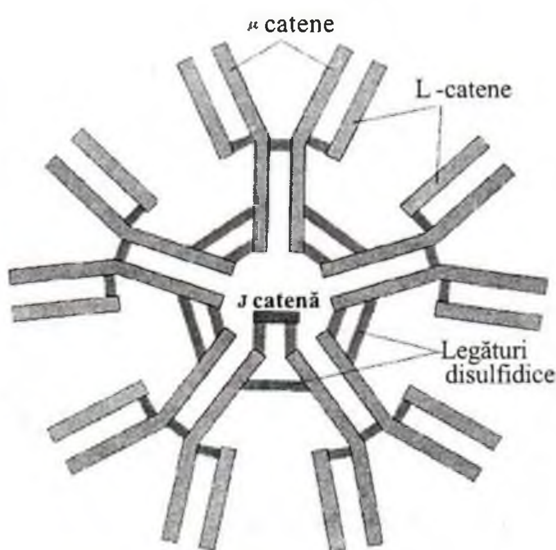


Figura 8.26. ***Pentamerul de IgM***

IgE sunt sintetezate de către plasmocite în întregul țesut limfoidal, dar mai ales în cel din mucoasă intestinală şi cea a tractului respirator. Fixîndu-se rapid pe membranele mastocitelor şi bazofilelor, determină degradarea lor şi eliberarea de kinine, prostaglandine, histamină cu rol de mediatori în hipersensibilitatea imediată. Se consideră că astmul bronşic are o asemenea patogenie. În molecula de IgE Fc-regiunea se leagă de receptorii specifici proteici de pe suprafața celulelor (labrocite) în țesuturi şi de leucocitele bazofile din sînge, cu o compatibilitate mare (fig.8.28). IgE fixate devin receptori pentru antigeni, la legarea ultimilor aceste celule secretează substanțe biologice active (histamina, serotonina), responsabile de hipersensibilitatea imediată de tip anafilactic.

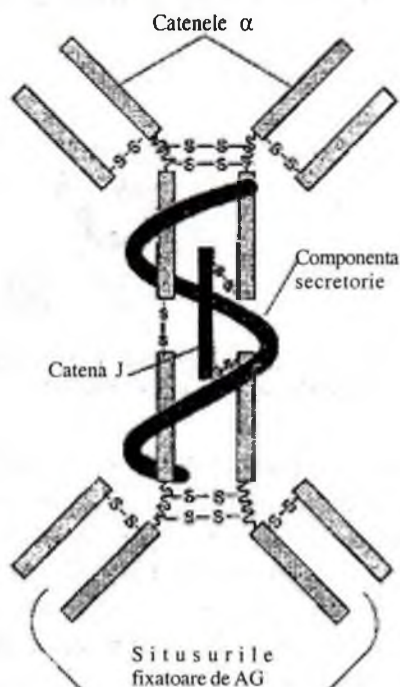


Figura 8.27. ***Structura moleculei dimerice de Ig A***

Concentrațiile imunoglobulinelor din plasma umană pot fi reprezentate relativ: G = 1250 mg%; A = 210 mg%; M = 150mg%; D = 3mg%; E = 0,03mg%. Anticorpii inițiază procesul de liză a microorganismelor prin fagocitoză, complement. S-a stabilit că celulele acoperite cu anticorpi pot fi distruse şi de nişte celule cu receptori ce identifică regiunea

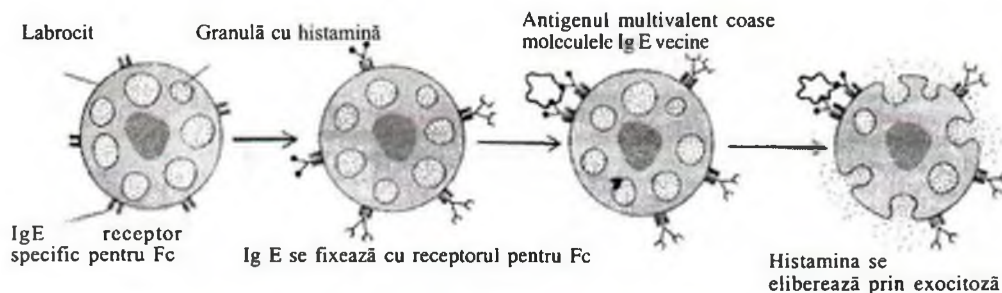


Figura 8.28. ***Labrocitele pasiv devin posesoare de receptori, ce leagă antigenul. IgE secretate de B-limfocite se fixează de receptori pe suprafața labrocitelor care recunosc regiunea Fc a anticorpilor***

Fc a anticorpilor. Cele mai active dintre ele sunt denumite NK-celule-Natural Killer, se aseamănă cu limfocitele, dar nu sunt T sau B-celule. Mecanismul nu e elucidat complet.

Structura anticorpilor

S-a stabilit că fiecare (L şi H) lanţ al imunoglobulinelor constă din regiunea variabilă cu o lungime de aproximativ 110 resturi de aminoacizi la capătul N-terminal, urmată de o regiune constantă, cu aceeaşi lungime în L-lanţ şi de 3-4 ori mai mare în lanţul H. Fiecare lanţ include domenii repetabile compacte în acelaşi mod: lanţul L posedă un domeniu în partea variabilă şi unul în cea constantă; lanţul H - unul în V-regiune şi 3-4 în constantă. Variabilitatea secvenţei de aminoacizi în V-regiuni ale lanţurilor L şi H e constrînsă de cîteva regiuni hipervariabile, care sunt foarte apropiate spaţial de unul din capetele moleculei şi formează situsul de fixare a antigenului. Un astfel de situs are dimensiuni adecvate pentru contactarea cu antigenul determinat de mărimea valorii a 5-6 resturi de zahăr (fig.8.29).

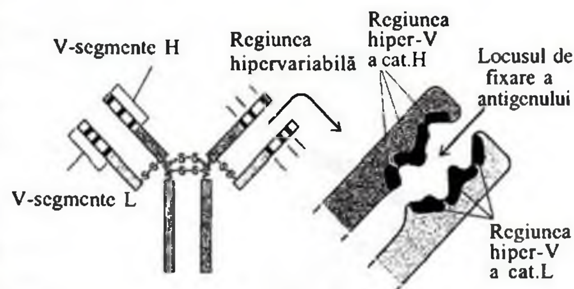


Figura 8.29. ***Schema ilustrează formarea locusului de fixare a antigenului în molecula de anticorpi***

Analiza roentgenostructurală a confirmat structura spaţială a Ig. Toate au aproape structură tridimensională similară. Fiecare domeniu reprezintă un cilindru cu dimensiunile 4x2,5x2,5 nm, aidoma unui "sandviş" compus din două straturi proteice – unul format din trei, altul din 4 segmente de lanţ polipeptidic. Catenele fiecărui strat sunt antiparalele şi astfel formează β-structura; 2 straturi sunt aproape paralele, joncţionate printr-o legătură disulfidică. Regiunile hipervariabile sunt situate în trei anse hipervariabile şi formează situsul de fixare a antigenului. S-a stabilit că regiunea variabilă are o structura rigidă conservativă, la unul din capete sunt fixate ansele hipervariabile. Numeroase site-uri de fixare se formează datorită modificărilor aminoacide în regiunile hipervariabile, fără modificări în conformaţia structurală necesară pentru funcţionarea anticorpilor (fig.8.30).

Care sunt mecanismele de sinteză a anticorpilor? Investigaţiile din ultimii ani au

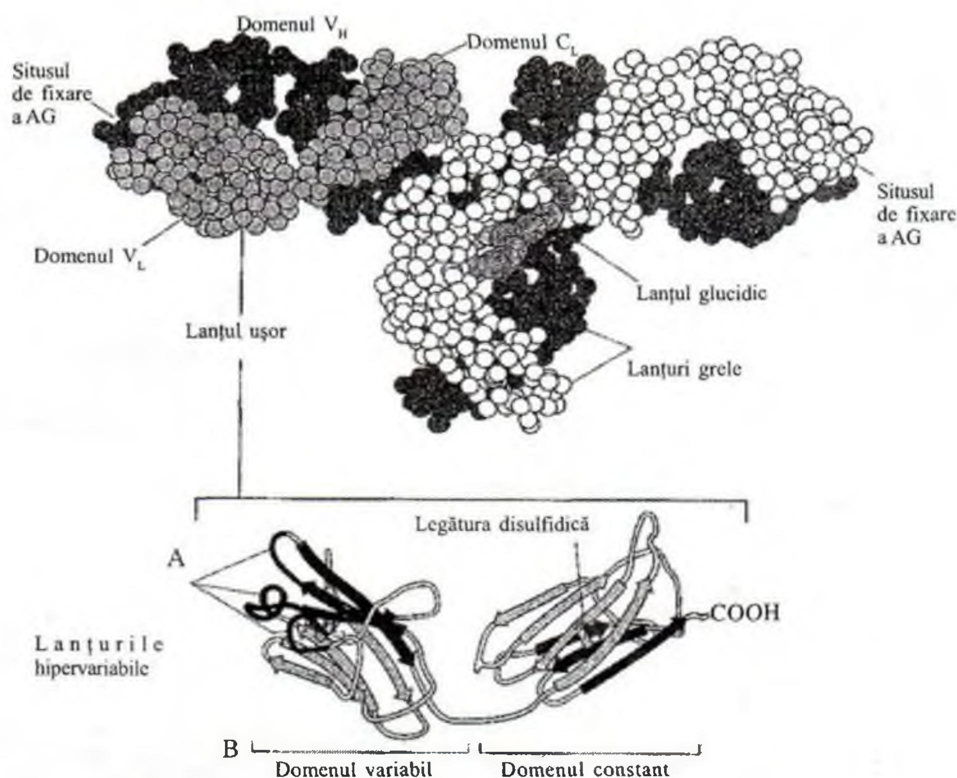


Figura 8.30. ***Structura spaţială a moleculei IgG***
A - fiecare rest de aminoacid e reprezentat prin bila mică;
B - aranjarea spaţială a lanţului uşor (L). Ambele domenii sunt prezente în β structură.

demonstrat că fiecare tip de lanţ al Ig - uşor (k şi λ) şi greu este codificat de o grupă mare (pul) de gene utilizate la sinteza fiecărui lanţ. Fiecare pul conţine un număr diferit de V-gene localizate la sute de mii de nucleotide spre capătul 5'-terminal al DNA codificat. În procesul de dezvoltare a B-celulelor, fiecare dintre V-gene poate fi translocată în aşa mod încît să se localizeze lîngă C-gena. Numai după o astfel de restructurare e posibilă sintetizarea lanţului imunoglobulinei.

Pulul de gene ce codifică Kapa, Lambda şi H- lanţul se situează în diferiţi cromozomi şi este foarte compus. Codificarea V-regiunii a L-lanţului comportă un mecanism foarte complicat, cu formarea unei mRNA, inclusiv o secvenţă de gene V, J, C.

Regiunea variabilă a H-lanţ e codificată şi mai dificil. Gena are un segment în plus D (diversity gene segment), numărul lor nu se ştie precis (mai mult de zece la şoareci). Ca rezultat al unei serii de site-uri – recombinaţii specifice, D-segmentele contribuie la formarea unei V_H gene funcţionale. Numărul de variaţii ale V_H e de 10 ori mai mare. Variaţia anticorpilor creşte datorită recombinaţiilor somatice de coeziune a lanţurilor L şi H, precum şi a mutaţiilor somatice, care nu numai că măresc variabilitatea anticorpilor, dar servesc şi la restructurarea lor fină la răspunsul imun.

Comutarea sintezei de la forma imunoglobulinelor legate (sesile) la cele secretate (sanguine) e unica modificare ce poate avea loc în regiunea C a lanţurilor grele în evoluţia B-celulelor. Toate B-celulele îşi iniţiază activitatea, cu sinteza anticorpilor - Ig

M. Ulterior, multe dintre ele se comutează la elaborarea anticorpilor de altă clasă - G sau A, cu proprietăţi biologice noi.

Sistemul complement

Acest sistem completează acţiunea anticorpilor specifici asupra celulelor străine. E principalul sistem efector, cu ajutorul căruia anticorpii protejează organismul vertebratelor de majoritatea infecţiilor bacteriene. Complementul, cu participarea anticorpilor, contribuie nu numai la distrugerea celulelor, dar şi atrage focarul de infecţie – fagocitele măresc capacitatea lor de a îngloba şi a liza microorganismele.

Complementul e un sistem compus din proteine, ce include circa 20 de componente. Toate reprezintă proteine solubile, ce circulă în sînge sau în lichidul celular. Majoritatea lor manifestă stare inactivă.

Participantele la sistemul complement conlucrează prin intermediul unui lanţ de reacţii de activare în "cascadă". Se disting trei unităţi funcţionale macromoleculare: unitatea de identificare şi alarmă e macromolecula C_1 constituită din C_{1q}, C_{1r}, C_{1s}. C_{1q} – proteină majoră compusă din 6 fascicule în formă de lalea. Fiecare are cîte un cap de proteină globulară şi o coadă colagenoasă (fig.8.31).

Fiecare cap se fixează de regiunea C a anticorpilor G sau M numai în cazul în care celălalt capăt al moleculei de anticorpi corespunzătoare a fixat antigenul. Rezultă activarea lui C_{1q} şi declanşarea fazei timpurii a cascadei proteolitice *a căii clasice*. Activarea comportă o aglomeraţie de antigeni şi determinante străine pe suprafaţa microorganismelor.

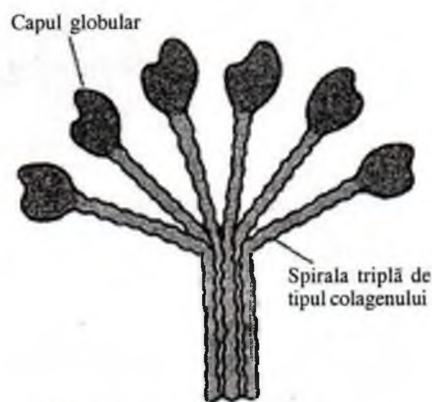


Figura 8.31. *Schema structurală a C_{1q}*

Ulterior, $C_{1q} \longrightarrow C_{1r} \longrightarrow C_{1s} \longrightarrow C_4$ se activează şi se fixează de membrană, adiţionînd C_2. Complexul C_{42} e numit *C_3 convertază*, care scindează C_3 cu formarea a 2 fragmente C_{3a} şi C_{3b}. Ultimul se leagă rapid cu membrana - ţintă lîngă C_{42}, cu formarea complexului C_{423b} sau *C_5 convertază* clasică, care, la rîndul său, scindează C_5 la C_{5a} şi C_{5b}. Complexul format adiţionează la C_6. Ca rezultat, se iniţiază asamblarea componentelor, cu formarea *complexului de citoliză* $C_7+C_8+C_9 \longrightarrow C_{56789}$ (fig.8.32).

Unitatea de activare include componentele $C_{4,2,3}$ şi ionii de Mg^{++}. În acelaşi timp, este activată şi *calea alternativă* – un lanţ de reacţii cu legătura inversă pozitivă, ce amplifică elaborarea iniţială de C_{3b}. Această cale poate fi activată şi în lipsa anticorpilor de polizaharide situate în fragmentele celulare ale bacteriilor, drojdiilor. Se consideră că acest mecanism determină linia întîi de apărare contra infecţiilor, pînă la formarea răspunsului imun. Componentele principale sunt C_{3b}, factorul B şi D.

Iniţierea comportă adiţionarea factorului B la C_{3b} fixat de membrană. Circulînd în sînge, factorul activ D scindează factorul fixat B, cu formarea unui fragment activ B_6. În consecinţă, se formează C_3 convertaza căii alternative - $C_{3b}B_b$. C_3 – convertaza formează suplimentar C_{3b}. Cîteva molecule C_{3b} se fixează de membranele-ţintă în apropie-

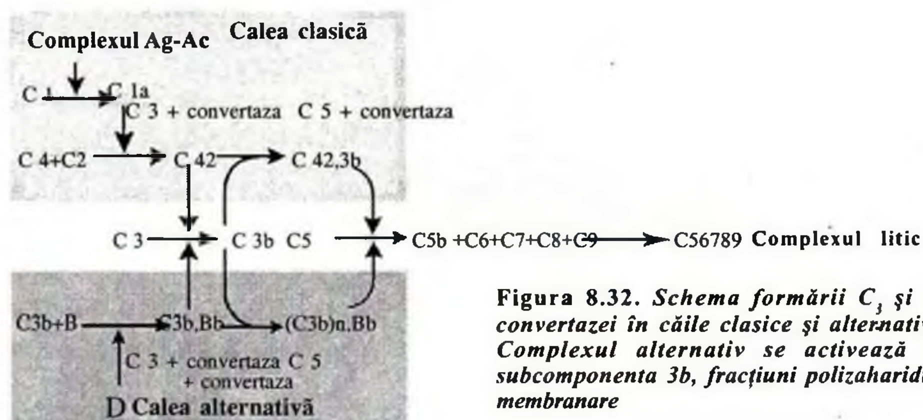


Figura 8.32. ***Schema formării C_3 și C_5 convertazei în căile clasice și alternative. Complexul alternativ se activează de subcomponenta 3b, fracțiuni polizaharidice membranare***

rea $C_{3b}B_b$, cu formarea C_{-5} convertază a căii alternative, ce scindează $C-_5$, astfel inițiind asamblarea *complexului citolitic*. Pentru această cale sunt obligatorii ionii Mg^{++}, pentru calea clasică – ionii de Ca^{++}. C_{3b} din calea clasică automat activează cea alternativă. Polizaharidele membranare ale unor tipuri de microorganisme protejează moleculele C_{3b} fixate de membranele de degradare și, în consecință, pot activa calea alternativă.

C_{3b}posedă unele proprietăți deosebite:

1) Favorizează formarea proprie (C_{3b}) și, adiționînd la C_3 - convertaza, formează C_5 - convertaza.

2) C_{3b} se fixează de receptorii proteici specifici pe macrofage și leucocite neutrofile, amplificînd capacitatea acestor celule de a fagocita celula la care a adiționat C_{3b}. Adică, exercită un rol primordial de protecție în lipsa complexului citolitic. În cascada proteolitică a activării complementului se formează cîteva fragmente proteice biologic active (C_{3a}, C_{4a}, C_{5a}), care stimulează secreția histaminei de către bazofile și labrocite; servesc ca substanțe hemotaxice pentru leucocitele neutre. Aceste substanțe sunt responsabile pentru reacția inflamatorie, însoțită de activarea complementului.

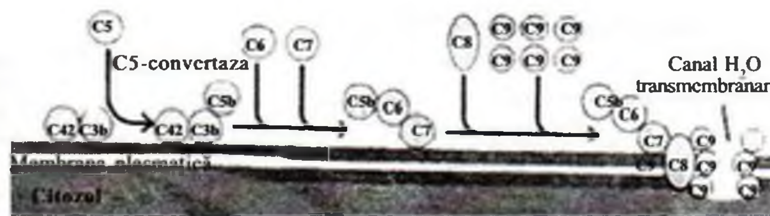
S-a stabilit că 2 complexe C_{56789} (b) (legate de membrană la locul de inițiere a activației complementului) formează *un complex major citolitic* de o masă egală cu 2 milioane Da. Complexul conferă membranei permeabilitate, destabilizînd stratul bilipidic și formînd canale integrale, ce permit pătrunderea apei, cu tumefierea și liza celulei. Procesul e foarte intensiv. Un canal e capabil să distrugă celula, dezorganizarea membranelor plasmatice constituind factorul primordial (fig.8.33).

Cascada complementului se reglează astfel încît componentele active principale să fie rapid inactivate prin 2 metode:

1) Sîngele conține proteine specifice inhibitoare ce stăvilesc cascada, legînd sau scindînd unele componente îndată după activare (C_1);

2) Mecanismul e bazat pe instabilitatea unor componente active – dacă ele nu se leagă imediat cu un anumit component al lanțului sau cu membrana, rapid se inactivează (C_4 și C_{3b}). Perioada de înjumătățire e mai mică decît 0,1ms. De aceea, atacul complementului e limitat de suprafața membranei microorganismului și nu se răspîndește asupra celulelor normale ale organismului.

Figura 8.33. *Schema asamblării componentelor tardive ale complementului cu formarea canalului transmembranar, compus din 12 molecule C_9 ale complexului citolitic*



T-limfocitele şi imunitatea celulară

Conţin la suprafaţă receptori antigenici specifici, natura biochimică a lor nefiind elucidată complet.

La activarea cu antigen, aceste celule se înmulţesc şi se diferenţiază în celule-efectoare responsabile de reacţiile imune celulare. Se atestă cel puţin trei reacţii diferite:

1) afectează specific celulele străine sau proprii, infectate de viruşi;

2) favorizează răspunsul limfocitelor T şi B la antigen şi pot activa macrofage;

3) conferă un efect supresor asupra T şi B limfocitelor. Aceste funcţii sunt determinate de diferite subpopulaţii de T-celule: *T-celule citotoxice (Tc)*, *T-celule helpere (Th-inductori)* şi *T-celule supresoare (Ts)*.

Unele T-helpere reacţionează la antigen, eliminînd anumite substanţe care activează diferite leucocite şi limfocite, denumite *limfokine* sau *interleukine* (mesager între leucocite). Acestea nu acceptă şi nu interacţionează cu antigenul.

Factorul perfect studiat şi de o importanţă majoră, ce inhibă migrarea macrofagelor, e *MIF (microphage inflamatory factor)* care stopează migraţia lor şi-i depozitează în regiunea unde-s activate T-celulele. Îi activează favorizînd fagocitoza şi liza – mecanism ce serveşte la protejarea de bacilul Koch. Acest efect stă la baza probei cu tuberculina intracutanată – *limfokininele* provoacă aglomerarea macrofagilor ce formează o tumefiere caracteristică – o reacţie pozitivă. O altă limfokinină, ce elimină numai un tip anumit de T-helpere, e *interleukina-2* – factorul de creştere a T-celulelor. El se fixează de receptori pe suprafaţa T-celulei activate de antigen şi stimulează proliferaţia lor. Receptorul e compus din două lanţuri polipeptidice – cel mare cu o masă moleculară de 75 kDa şi cel mic – 55 kDa (fig.8.34). Fiecare lanţ se fixează de molecula interleukinei-2. Interacţiunea cu

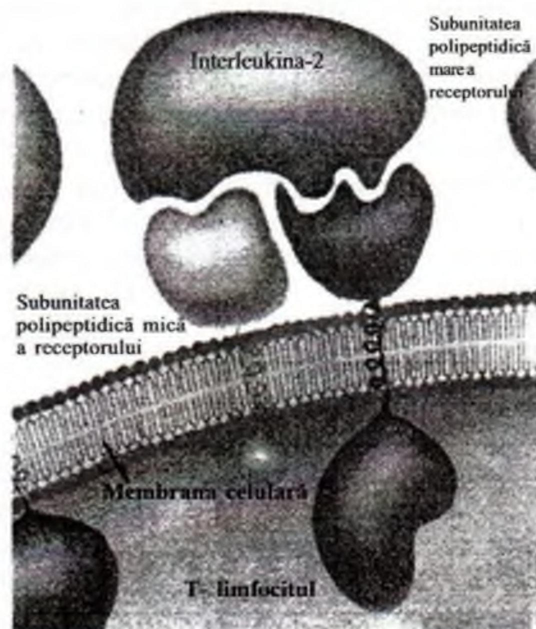


Figura 8.34. *Receptorul la interleukina-2*

catena mare semnalează divizarea celulei. Proliferarea T-limfocitelor poate fi redată astfel: macrofage, înglobînd antigenul, îl prezintă pe suprafața sa, unde antigenul va contacta cu T-celulele specifice, activîndu-le. Stimulate de antigen, T-limfocitele secretează *interleukina-2*. Astfel, pe suprafața lor se formează receptori specifici. Fixarea interleukinei-2 devine semnal pentru divizarea celulei. În final, apar T-celule - fiice, ce reacționează la același antigen (fig.8.35).

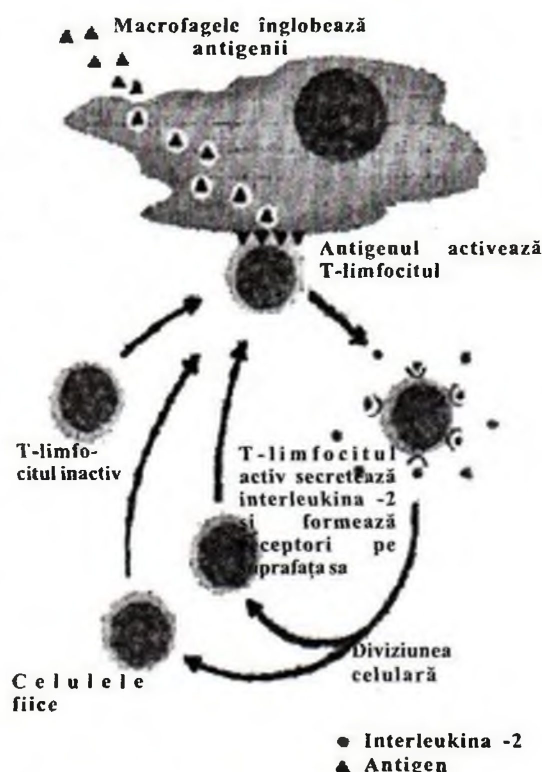


Figura 8.35. ***Schema proliferării T-limfocitelor***

Clona celulelor antigenospecifice identice va evolua atîta timp cît, grație activității sistemului imun, va dispare antigenul din organism.

Proliferarea clonei specifice se stopează, însă T-celulele antigenospecifice rămase formează populația de memorare a sistemului imun.

T-limfocitele reprezintă un tip unic de celule stimulate de interleukina-2. S-a constatat că celulele cu NK activitate (natural Killer) sunt stimulate de interleukina-2. Aceste celule reprezintă pînă la 10% din numărul total de limfocite circulante. Se consideră că ele participă la protecția imună contra celulelor cancerigene. De altfel, ele determină și reacția primară a organismului la virus. Spre deosebire de T-limfocite, NK-celulele nu posedă receptori antigenici și, posibil, există permanent în stare activă. S-a constatat că în NK-celule porțiunea mare a receptorului se sintetizează încontinuu la intervenția interleukinei-2. Dacă cultura în permanență va conține antigen și interleukina-2, T-celulele se vor reproduce încontinuu. Anume astfel se elaborează linii pure de T-celule de toate tipurile.

T-supresoarele funcționează numai în cazul în care sunt permanent stimulate de T-helpere, care, la rîndul lor, sunt inhibate de supresor – autoreglarea prin retroinhibiție. T-supresoarele provoacă toleranță la diferiți antigeni (insensibilitate).

Unul din mecanismele ce determină interacțiunea T-celulelor reglatoare cu B-celule sau alte T constă în identificarea antigenului impropriu fixat pe suprafața celulei-țintă.

Limfocitele transmit semnalele prin secreția unor molecule specifice ce acționează la distanțe relativ mari. Din T-limfocite au fost izolate proteine reglatoare solubile – *factorii Helper* și *factorii supresori, factori cu proprietăți specifice antigenice*, la fel ca și celulele ce le secretează. E posibil că ei reprezintă receptori membrano-fixatori,

desprinşi de la celula T, care ar reacţiona specific cu celulele B, inducînd în descendenţa acestora sinteza de anticorpi specifici.

Reacţiile la transplant reflectă o ripostă dată variantelor de antigeni străini de pe suprafaţa celulară, fiind denumite *antigeni ai histocompatibilităţii*. Dintre aceştia, o importanţă primordială o are familia de antigeni codificată de un complex de gene, denumit *complexul de histocompatibilitate majoră* (MHC).

Antigenii acestui complex posedă unele particularităţi:

1) Ocupă un loc prioritar printre antigenii-ţintă după rolul acestora în reacţiile T-celulare ale transplantului.

2) Aceşti MHC-antigeni străini acceptă un procent mare de T-limfocite (5-10% de T-celule), pe cînd la un antigen obişnuit reacţionează mai puţin de 0,1% de T-celule.

Se evidenţiază două clase de MHC antigeni: la oameni – numite şi *HLA (Human-leukocyte-antigen)* – au fost descoperite primar în leucocite. Ambele clase (1 şi 2) denotă un complex de glicoproteine ale suprafeţei celulare (fig.8.36 a,b,c). La clasa I reacţionează celulele T-citotoxice, pe cînd T-helperele – la glicoproteinele străine de clasa II. S-a stabilit că aceşti antigeni, care stimulează două subpopulaţii diferite de T-celule, au funcţii diferite.

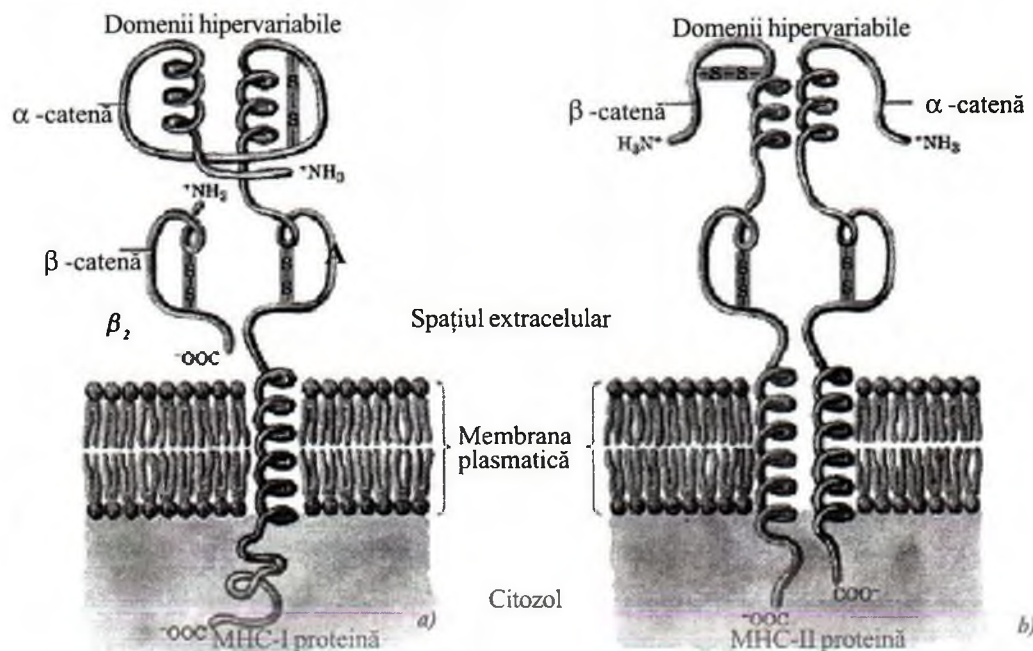


Figura 8.36. *MHC glicoproteine. Molecula MHC-I e necovalent fixată cu $β_2$- microglobulină, care-i omoloagă cu domeniul imunoglobulinelor şi nu e codificată în MHC. Domeniul A de asemenea e omolog cu cel din imunoglobuline.*

Glicoproteinele *MHC* ale clasei I au proprietăţi anumite:

1) Antigenii sunt situaţi pe suprafaţa majorităţii celulelor somatice, care posedă nucleu şi reprezintă pînă la 1% din proteinele membranei plasmatice ($5x10^5$ molecule la celulă).

2) Sunt asociați necovalent cu o proteină mică – *β_2–microglobulină* codificată de o genă, localizată în alt cromozom – proteină omoloagă cu un domeniu de imunoglobuline, ce indică asupra legăturii evoluționiste între aceste proteine.

3) Locusurile ce codifică aceste glicoproteine sunt cele mai polimorfe dintre toate cele cunoscute pînă azi, la animalele vertebrate superioare. În fiecare locus al fiecărei specii există un număr mare de alelee (forme alternative ale uneia şi aceleiaşi gene).

Varietatea MHC diferă de varietatea anticorpilor prin natura lor. Specia conține sute de glicoproteine, însă individul moşteneşte ereditar cîte o alelă a fiecărui locus de la fiecare din părinți şi de aceea acest individ are maximum 2 forme de glicoproteine respective, pe cînd anticorpii – milioane.

Antigenii *MHC-II* nu se propagă pe larg, fiind caracteristici numai unor celule: majoritatea B-limfocitelor, unele T-limfocite, macrofage sau analogii lor. Se compun din două lanțuri polipeptidice fixate necovalent (α - 33000 Da şi β - 28000 Da), integrate în membrană şi glicozilate. Majoritatea T-limfocitelor identifică antigenii de la suprafața celulelor doar atunci cînd aceştia sunt asociați cu MHC glicoproteine proprii. Astfel de proprietate a T-limfocitelor e denumită *recunoaşterea asociativă a MHC*.

Eventualul fenomen incită atenția T-limfocitelor şi o canalizează spre suprafețele celulare, la care fiecare categorie de antigeni emite răspuns imun specific.

Antigenii virali se asociază numai cu MHC-I şi activează T-limfocitele citotoxice (viruşii, practic, atacă toate celulele somatice cu nucleu). Antigenii bacterieni se fixează de MHC-II, stumulînd T-helperele ce activează B-celulele şi macrofage, apoi amplifică fagocitoza, cu implicarea complementului.

Deocamdată, mecanismele moleculare de identificare nu sunt descoperite. Sunt înregistrate doar date indirecte, care confirmă că unele T-helpere identifică fragmente de macromolecule străine dege-

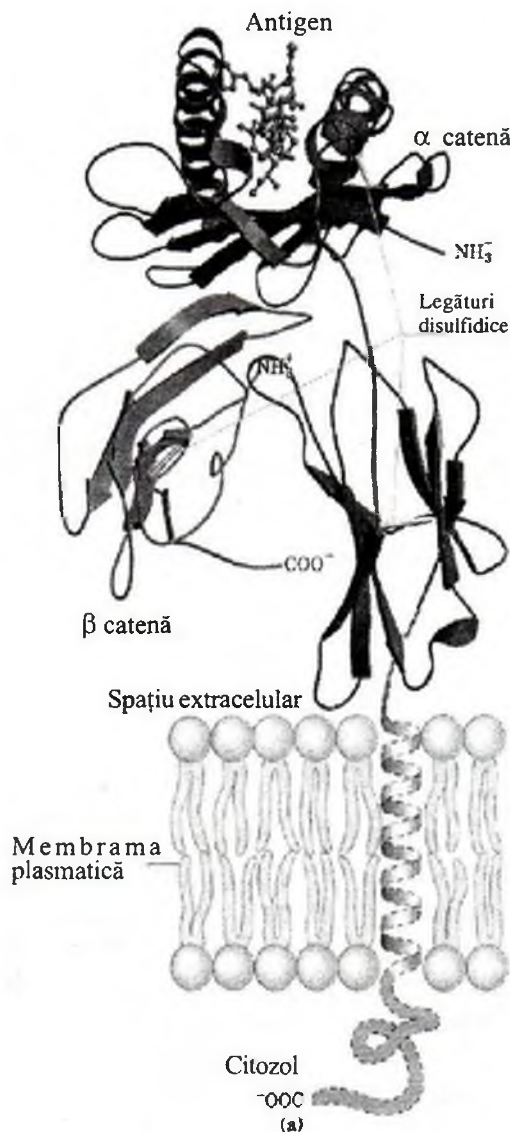


Figura 8.36c. ***Structura MHC I proteinei umane.***

nerate, fixate de glicoproteinele MHC-II şi, ca rezultat, se activează T-helperele. T-celula activă identifică un complex analog de determinare antigenică cu MHC-II pe suprafaţa B-celulei şi o activează.

Nici mecanismul de identificare a T-celulei şi, simultan, a antigenului străin, precum şi a glicoproteinelor MHC, nu e limpede. Au T-celulele un receptor sau doi, diferiţi?

O sensibilitate deosebită a T-celulelor la moleculele străine de MHC în transplant elucidează faptul că ele pot identifica antigenii străini numai în asociaţie cu glicoproteinele MHC proprii. Posibil că multe T-celule reacţionează cu glicoproteinele MHC străine din cauza asemănării complexelor moleculelor MHC proprii, cu fragmentele de antigeni străini. Ipoteza precum că glicoproteinele MHC se asociază cu antigenii străini şi îi prezintă pe aceştia T-celulelor explică polimorfismul deosebit al moleculelor de MHC. În procesul evolutiv s-a creat varietatea mare de molecule MHC în populaţii capabile să fixeze modificările antigenilor în microorganisme.

Răspuns imun la infecţia virală

Un nou antigen este des vestitorul unui proces infecţios – un semnal pentru sistemul imun – că un virus sau alt parazit ar putea să se dezvolte rapid în organism. Puţinele T şi B celule care posedă receptori sau anticorpi şi pot lega antigenul trebuie să fie rapid şi selectiv propagate ca să înlăture infecţia. O infecţie virală ipotetică este ilustrată în figura 8.37.

Cînd un virus infectează o celulă, el profită de funcţiile şi structurile ei, ca să replice acidul nucleic propriu şi să producă proteinele virale. Aflîndu-se în interiorul celulei, macromoleculele virale sunt relativ inaccesibile pentru anticorpii sistemului imun umoral.

Totuşi, unele proteine din clasa MHC -I se vor deplasa spre suprafaţa celulei infectate, vor prezenta fragmente peptidice din proteinele virale, care apoi pot fi recunoscute de către Tc limfocite. Viruşii maturi devin vulnerabili faţă de sistemul inum umoral cînd sunt eliberaţi de celulele infectate şi sunt prezenţi pentru un timp în mediul extracelular. Unii sunt apoi ingeraţi de macrofage, care ingerează doar acei antigeni care sunt recunoscuţi de către anticorpii produşi de anumite B-celule. Fragmentele de peptide virale vor fi prezentate pe suprafaţa macrofagelor şi a B-celulelor, fixate de proteinele MHC-II. Antigenele peptidece vor declanşa un răspuns multicomponent ce antrenează celule B,Tc şi T_H.

Complexele protein-peptid MHC-I de pe celulele infectate sunt recunoscute ca străine şi sunt fixate de receptorii T-celulelor ce au specifitate respectivă. Receptorii T-celulelor răspund doar la antigenii peptidici legaţi cu proteinele MHC-I. Celulele Tc posedă un receptor adiţional CD8, numit *coreceptor*, care intensifică interacţiunea receptorilor T celulelor cu proteinele MHC. Celulele Tc activează cu celule T-killer şi lizează celulele infectate cu viruşi. Moartea celulei este cauzată de mai multe mecanisme, unele neînţelese. Un mecanism implică eliberarea *perforinei* – proteină ce se leagă şi agreghează la membranele plasmatice a celulei-ţintă, formînd pori care distrug capacitatea celulei de a regla mediul intern. Celulele Tc de asemenea induc *apoptoza,* în care celulele complexate la Tc suferă modificări metabolice ce conduc la emisia celulei.

Celulele Tc cu specificitate adecvată trebuie să prolifereze selectiv, dacă e prezent un număr mare de celule infectate cu viruşi. În acest scop, celulele Tc se fixează la celula

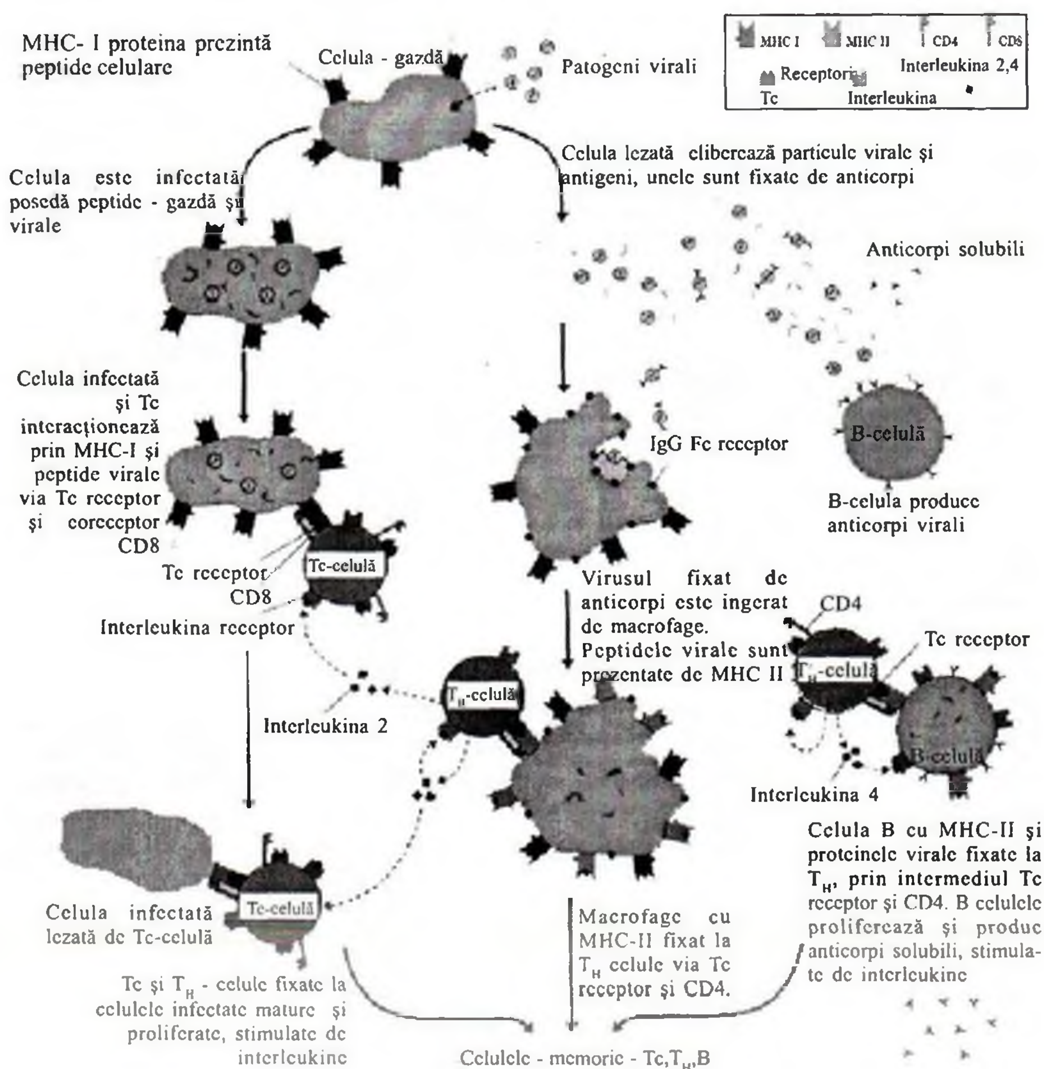


Figura 8.37. *Răspuns imun posibil la infecţia virală*

infectată care generează receptori celulari la suprafaţă pentru proteinele de semnalare numite *interleukine*. *Interleukinele* secretate de către o varietate de celule stimulează proliferarea doar a celulelor B şi T purtătoare de receptori respectivi. Celule ale sistemului imun ce proliferează şi răspund la antigeni sunt puţine. Procesul de generare a unei populaţii de celule prin reproducere specială este numită *selecţie clonală*.

Peptidele fixate la proteinele MHC-II şi prezentate pe suprefeţele macrofagelor şi B-limfocitelor sunt legate similar de receptorii specifici ai T_H -celulelor. Ultimele, de asemenea posedă un coreceptor numit CD4, care stimulează interacţiunile cu receptorii T- celulelor. Această interacţiune în asociere cu semnalele moleculare secundare, care sunt identificate curent, activează T_H- celulele. O subpopulaţie de T_H- celule activate

secretează o proteină de semnalare mică – *interleukina 2*, care stimulează proliferarea celulelor. Tc şi T_H-celulele au receptori corespunzători. În final, sporeşte esenţial numărul celulelor sistemului imun, capabile să recunoască şi să răspundă la antigeni.

O altă subpopulaţie de T_H -celule activate fixate la macrofage şi B- limfocite secretează *interleukina 4* care intensifică proliferarea B celulelor ce recunosc antigenul. Proliferarea celulelor B, Tc şi T_H continuă atîta timp cît antigenul respectiv este prezent. Celulele B proliferative promovează distrugerea viruşilor şi/sau a celulelor bacteriene. În primul rînd, ele secretează o cantitate mare de anticorpi solubili care se leagă cu antigenul. Aceşti anticorpi fixaţi activează un sistem celular complex compus din 20 proteine, numit *complement*. Acest sistem completează şi stimulează acţiunea anticorpilor. Proteinele sistemului distrug învelişul multor viruşi sau infecţii bacteriene, produc găuri în pereţii celulari, cauzînd tumefierea şi liza prin *şoc osmotic*.

Spre deosebire de T-celule, B-celulele nu suferă selecţie în timus ca să elimine anticorpi ce recunosc proteinele proprii. Oricum, B-celulele nu contribuie semnificativ la răspunsul imun, dacă nu sunt stimulate de către T_H -celule. Celulele T_H participă doar indirect în liza celulelor infectate şi agenţilor patogeni, rolul lor este critic în răspunsul imun. Aceasta devine evident la pandemiile provocate de HIV-viruşi. Ţînta infecţiei HIV sunt T_H -celulele. Eliminarea acestor celule degenerează întregul sistem imunitar. O dată ce antigenul este epuizat, celelule imune activate mor prin *apoptoză*. Oricum, puţine celule B şi T stimulate se maturizează în *celulele memoriei*. Acestea sunt celule cu o durată lungă a vieţii, care nu participă direct la răspunsul imun primar. În schimb, ele devin rezidenţi permanenţi ai sîngelui capabil să respundă la reapariţia antigenilor corespunzători. Celulele memoriei cînd sunt ulterior provocate de către antigen pot intensifica *răspunsul imun secundar* din cauza expansiunii clonate anterioare. Prin acest mecanism, vertebratele o dată expuse la virus sau alt agent patogen pot răspunde rapid la o intervenţie nouă. Asta este temelia *imunităţii de lungă durată*, oferită de către vaccine, şi a *imunităţii naturale* la infecţiile repetate de către aceeaşi specie de viruşi.

Superantigenii sunt proteine care conferă sistemului imun istovire, autodistrugere. Aceste proteine sunt capabile să activeze fiecare a cincea T-limfocit (normal 1 din 10000), majoritatea cărora sunt inutile în lupta cu infecţiile obişnuite. De asemenea, sunt în stare să provoace un atac autoimun, cu un efect contrar. Reprezentantă a impactului e grupa de proteine –*enterotoxinele stafilococe*, provocatoare ale *sindromului de şoc toxic*.

Numeroşi indici pledează pentru concepţia că la baza efectului patogenic al enterotoxinelor stă capacitatea lor de a stimula formarea *interleukinei-2* în cantităţi enorme.

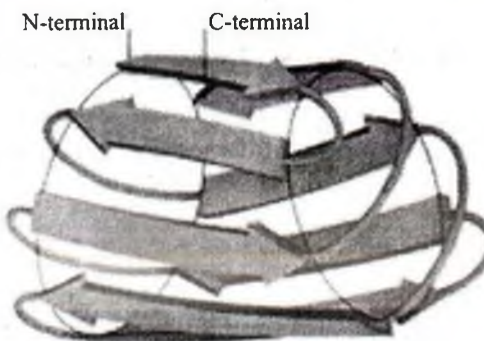


Figura 8.38. ***Forma cilindrică e caracteristică superantigenilor S.aureus. Sunt prezentate fragmentele de β-structură. Predominarea β-structurii exponează molecula proteică în mediu pentru o interacţiune majoră cu alte molecule***

Studiile recente confirmă că enterotoxinele reprezintă proteine cu dimensiuni mijlocii şi conţinut mare de aminoacizi hidrofili. Majoritatea moleculelor au β-structură. Există însă şi segmente de α-spirală – moleculă relativă necompactă (fig.8.38).

Enterotoxinele se comportă ca antigeni obişnuiţi, dar au şi unele particularităţi distinctive. Pentru ca T-limfocitul helper să accepte un antigen proteic obişnuit, trebuie să fie supus procesingului în macrofage sau în alte celule ce îi reprezintă. Aceste celule, înglobînd molecula de antigen, o scindează în peptide mici, ce sunt expuse pe suprafaţa celulară, în complex cu proteinele din MHC-II. Peptida e plasată în molecula MHC conform structurii sale. Apoi antigenul expus se leagă cu un număr mic de T-helpere ce posedă receptori specifici pentru peptide concrete.

Enterotoxinele, spre deosebire de T-helpere, se fixează de moleculele MHC direct, fără perioada de înglobare şi transformare: T-limfocitele sunt capabile să interacţioneze cu toxinele intacte. Molecula T-receptor celular, compusă din α şi β catene polipeptidice, are fragmente constante şi variabile după componenţa aminoacidică (fig.8.39).

Se consideră că enterotoxinele se fixează de V-fragmente în β-lanţ în acea porţiune care nu participă la legarea antigenului obişnuit. Fiecare endotoxină manifestă afinitate

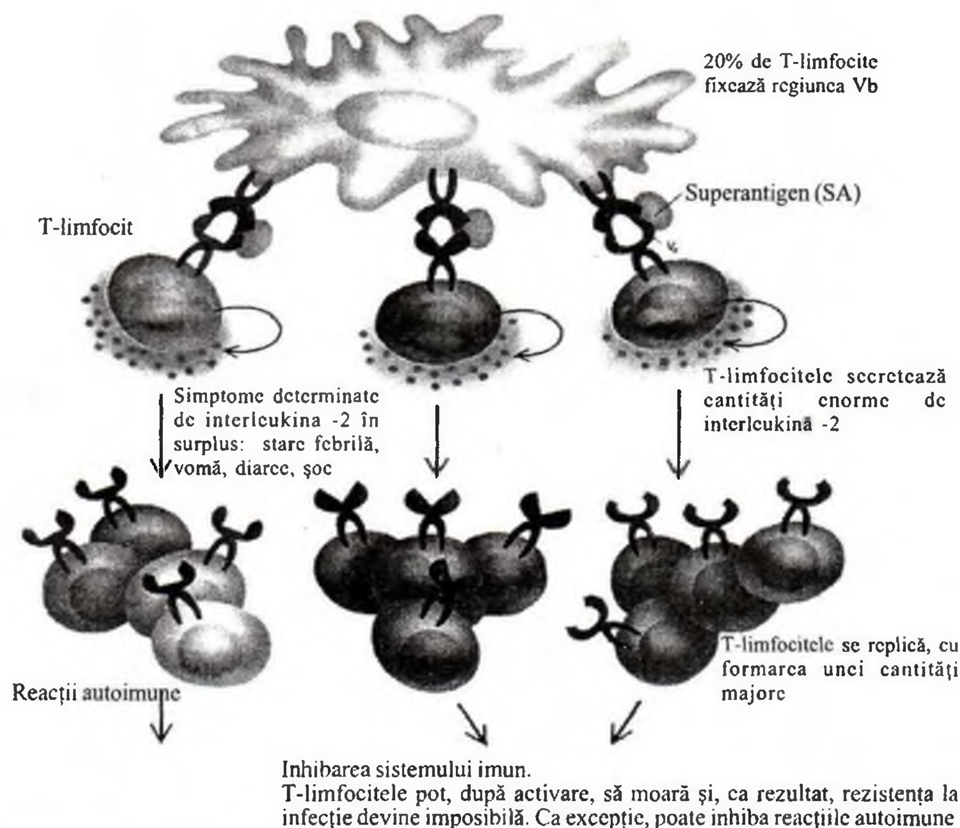


Figura 8.39. ***Răspuns imun la superantigeni***

față de un tip anumit V-fragment. S-a constatat că organismul omului conține mai mult de 30 tipuri de V-segmente, ceea ce oferă posibilitate enterotoxinelor să interacționeze cu o cantitate mare de celule.

Savanții consideră că *superantigenii* au un rol deosebit la *imunodeficiență* pe fundalul cancerului și SIDA. Deocamdată, nu poate fi ignorat și efectul negativ al *superantigenilor* asupra B-limfocitelor.

Investigațiile la obiect au permis concluzionarea că, utilizînd diferite fragmente peptidice cu proprietăți diferite, e posibilă elaborarea unor preparate medicinale, în baza superantigenilor, pentru corecția sistemului imun.

Sistemul imun protejează organismul uman de tumori de natură virotică. Imunitatea contra tumorilor induse de viruși nu se deosebește cu nimic de imunitatea contra altor infecții virale. *Tumorile* pot fi lichidate de macrofage sau de celulele-Killer naturale, celule nu prea mari, similare cu limfocitele. Spontan și relativ nespecific, ele distrug efectiv celulele tumorale. Celulele date nu necesită ca propria lor celulă-țintă să fie acoperită cu anticorpi.

Cele reflectate se referă, în special, la considerentul de apreciere a sistemului imun drept unic printre alte sisteme.

LITERATURA

1. Biochimie clinică (Patochimie). Eugen Mody, Ileana Funduc, Ruxandra Alexandrescu, Minodora Dobreanu – Bucureşti: ALL EDUCATIONAL, 2000.
2. Biochimie clinică. Fundamentare fiziopatologică/ sub redacţia M.Cucuianu, I.Crîsnic, Luminiţa Pleşca-Manea, Dacia, 1998.
3. Biochimia (probleme actuale, teste)/ Leonid Lîsîi; Univ. de Stat de Medicină şi Farmacie *Nicolae Testemiţanu*. – Ch.: Centrul Ed.-Poligr. Al USMF, 2003.
4. Bhagavan N.V.Medical Biochemistry. Fourth edition, Academic Press, 2002.
5. Champe, Pamela C.Biochemistry/ Pamela C. Champe, Richard A. Harvey. p.cm. – (Lippincott˝s Illustrated Reviews). Includes index.
6. Campbell Peter N., Smith Anthony D.Biochemistry illustrated. International edition. 2000.
7. Dati Francesco, Metzman Erwin. Proteins. Laboratory testing and clinical use. Includes index, 2005, Holzheim, Germany.
8. Diaconescu Luminiţa. Biochimie metabolică. Luminiţa Diaconescu, Cristina Drugan, Gheorghe Jebeleanu. Cluj-Napoca, SRIMA, 2001.
9. Garban Zeno. Biochimie: Tratat comprehensiv/Zeno Garban. Editura Didactică şi Pedagogică, R.A. Bucureşti. Ediţia 2-a, 1999.
10. Halkerston, Ian D.K. Biochemistry. (The national medical series for independent study). Includes index. 2nd edition, 1988.
11. Lîsîi I., Ivasi Gh., Mucuţa A. Biochimia în teste. G.E.P. USMF "Medicina", Chişinău – 1997.
12. Lîsîi L. Biochimie. Chişinău, 1999.
13. Marshall William J. Clinical Chemistry. Fourth Edition, 2000.
14. Metzler David E. Biochemistry. The chemical reactions of living cells. Second edition. Volume 1. Academic Press, 2003.
15. Metzler David E. Biochemistry. The chemical reactions of living cells. Second edition. Volume 2. Academic Press, 2003.
16. Murray Robert K., Granner Daryl K., Mayes Peter A., Rodwell Victor W. Harper˝s Illustrated Biochemistry, Twenty-Sixth Edition. International Edition, 2003.
17. David L. Nelson, Michael M. Cox. Lehninger principles of biochemistry/-3rd ed.p.cm. Includes index. 2000.
18. Olteanu Ileana. Biochimie descreptivă. Editura Medicală Universitară "Iuliu Haţieganu".Cluj-Napoca, 2001.
19. Olteanu Ileana, Gheorghe Jebeleanu. Biochimie metabolică. Editura Medicală Universitară "Iuliu Haţieganu".Cluj-Napoca, 2002.
20. Oxford dictionary of Biochemistry and molecular biology. Revised edition. Library of Congress Cataloging in Publication Data. 2000.
21. Quantities, symbols, units, and abbreviations in the life sciences: a guide for authors and editors/compiled by Arnošt Kotyk. Includes bibliographical references. 1999.
22. Weil Jacques-Henry. Biochimie générale. 9e édition. Dunod, Paris, 2001.
23. Назаренко Г.И., Кишкун А.А. Клиническая оценка результатов лабораторных исследований. – М.: Медицина, 2000.

INDEX

Editura "Universul"
Chişinău, str. Vlaicu Pârcălab, 45.
Formatul 70X100 1/16.
Comanda nr. 5193.